

GILBERTO ALVES DA ROCHA

# VIAS DE ATIVAÇÃO DO **COMPLEMENTO** EM MOLÉSTIA REUMÁTICA

Dissertação apresentada na conclusão do  
Curso de Pós-Graduação em Cardiologia,  
nível de Mestrado, pela Universidade Fe-  
deral do Paraná.

CURITIBA

1987

ORIENTADORES

PROF. ANDRÉ ALEXANDRE AGUIAR KAJDASCY-BALLA

PROF. FLÁVIO SUPLICY DE LACERDA JÚNIOR

Dedico este trabalho, fruto de pesquisa,  
a quem me deu a vida e a quem a integra.  
Não por último, o mesmo leva em seu bojo  
o eterno anseio do médico em contribuir  
para a idéia e a realidade da VIDA em si.

## AGRADECIMENTOS

- Aos pacientes do Hospital de Clínicas e de outros Hospitais de Curitiba, e aos indivíduos normais integrantes do grupo-controle, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.
- À CAPES e ao CNPq, pela bolsa concedida.
- Ao Prof. André Alexandre Aguiar Kajdacsy-Balla, orientador desta dissertação, pela sua incansável disposição, estímulo e indispensável orientação na estruturação deste trabalho.
- Ao Prof. Flávio Suplicy de Lacerda Júnior, co-orientador desta dissertação.
- Ao Prof. Gastão Pereira da Cunha, Coordenador do Curso de Mestrado em Cardiologia, do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela orientação recebida durante todo o curso.
- Aos Drs. Alberto Accioly Veiga, Ricardo Akel e Luiz Renato Teixeira de Freitas, que na ocasião desempenhavam, respectivamente, os cargos de Diretor Geral, Diretor da Divisão Médica e Diretor da Divisão Técnica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

- Ao Prof. Neil Ferreira Novo e à Srta. Yara Juliano, da Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva, pelo estudo estatístico da nossa casuística, meus sinceros agradecimentos.
- Ao Dr. Ênio Rogacheski, pelo auxílio ortográfico e pela revisão do texto.
- À Srta. Suzana Guimarães Castilho e seus auxiliares, pela orientação na pesquisa bibliográfica.
- Ao Dr. Antonio Carlos Boaretti e à Dra. Elisa Hacbarth, pela colaboração nas várias etapas do trabalho.
- Às Biomédicas, Elvira M. Doi, Margaret O. Tanaka, Mitoko Kuriki, do Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela incondicional compreensão e colaboração.
- Aos funcionários do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração prestada.
- Ao Prof. Cláudio L. Pereira da Cunha, pela sua colaboração ao estudo Ecocardiográfico dos pacientes.
- À Sra. Vera Maria Santos Lima Rosa, pelo eficiente trabalho de datilografia desta dissertação.
- Ao Dr. Aparecido B. Pereira e à biomédica Sônia K. Niskida, pelos exames realizados no Laboratório de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina.

## SUMÁRIO

	Página
ORIENTADORES .....	ii
DEDICATÓRIA .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
SUMÁRIO .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO .....	xiv
SUMMARY .....	xvi
 I - INTRODUÇÃO .....	 1
 II - MOLÉSTIA REUMÁTICA .....	 4
 III - O COMPLEMENTO E IMUNECOMPLEXOS .....	 9
1 - O SISTEMA DO COMPLEMENTO E VIAS DE ATIVAÇÃO.	11
1.1 - O Sistema do Complemento .....	11
1.2 - Vias de Ativação do Complemento .....	17
1.3 - Métodos de Avaliação do Complemento ..	23
2 - IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES .....	30
2.1 - Introdução .....	30
2.2 - Propriedades Biológicas dos Imunecom- plexos .....	30
2.3 - Demonstração de Imunecomplexos em Doen- ças Humanas .....	31

	Página
2.4 - Significado Clínico da Detecção de Imunecomplexos em Doenças .....	33
3 - IMUNECOMPLEXOS NA MOLÉSTIA REUMÁTICA .....	33
4 - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NAS DOENÇAS REUMÁTICAS .....	36
5 - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NA MOLÉSTIA REUMÁTICA .....	38
IV - OBJETIVOS .....	40
V - PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS .....	42
1 - PACIENTES .....	43
2 - MATERIAL .....	48
2.1 - Preparo de Reagentes Imunoquímicos e Outros Materiais Biológicos .....	50
3 - MÉTODOS .....	52
VI - RESULTADOS .....	60
1.1 - DETERMINAÇÃO DE C4 E RELAÇÃO C4d/C4 .....	61
1.2 - DOSAGEM DO FRAGMENTO Ba .....	67
1.3 - CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba E A RELAÇÃO C4d/C4, OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO 1º DIA EM PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA .....	71
1.4 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS E OS RESULTADOS LABORATORIAIS DE PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA .....	73
1.5 - DOSAGEM DE IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES ....	75
1.6 - DOSAGEM DE CH <sub>50</sub> , C3 E C4 .....	77
VII - DISCUSSÃO .....	79
VIII - CONCLUSÕES .....	91

	Página
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
ANEXOS .....	104
1 - Protocolo de Investigação em Moléstia Reumática .....	105
2 - Pacientes com Moléstia Reumática Aguda - Identificação .....	115
3 - Dados Clínicos dos Pacientes com Moléstia Reumática Aguda .....	116
4 - Dados Laboratoriais dos Pacientes com Moléstia Reumática Aguda .....	117
5 - Dosagem de Imunecomplexos Circulantes no Soro do Grupo-Controle, Usando-se o Ensaio do Fator Reumatóide Monoclonal e o da Conglutinina .....	118
6 - Dosagem de Imunecomplexos Circulantes em Pacientes com Moléstia Reumática Aguda, Usando-se o Ensaio do Fator Reumatóide Monoclonal e o da Conglutinina .....	119
7 - Testes de McNemar - Tabelas .....	121



## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
I - ENVOLVIMENTO DO COMPLEMENTO NAS DOENÇAS HUMANAS .....	12
II - PRINCIPAIS PROPRIEDADES DOS COMPONENTES DO COMPLEMENTO E DE SEUS REGULADORES .....	15
III - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO .....	18
IV - ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO COMPLEMENTO .....	18
V - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4, OBSERVADOS NO GRUPO-CONTROLE E NO GRUPO DE PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA NO 1º DIA .....	62
VI - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4 EM PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA NOS 3 PERÍODOS ESTUDADOS ....	64
VII - RESULTADOS DOS NÍVEIS DA DOSAGEM DO FRAGMENTO Ba, DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA NO 1º DIA .....	68
VIII - NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba NOS PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA NOS 3 PERÍODOS ESTUDADOS ....	70
IX - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE POSTOS DE SPEARMAN ENTRE OS NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba E A RELAÇÃO C4d/C4 .....	72
X - RESULTADO DO EXAME CLÍNICO E DAS PROVAS LABORATORIAIS EM PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA.	74

XI	-	DOSAGEM DE CH <sub>50</sub> , C3 E C4 EM PACIENTES COM MO- LÉSTIA REUMÁTICA, NAS AMOSTRAS DO 1º DIA E 6º MÊS .....	78
----	---	--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - DIAGRAMA DOS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO "EM CASCA- TA" DO SISTEMA COMPLEMENTO (VIAS DE ATIVAÇÃO).	24
2 - IMUNOELEKTROFORESE "EM FOGUETE" PARA A DETERMI- NAÇÃO DE C4 E C4d .....	53
3 - IMUNOELEKTROFORESE PADRÃO UTILIZANDO ANTI-SORO ANTIFATOR B .....	55
4 - DEMONSTRAÇÃO DE Ba POR IMUNOELEKTROFORESE "EM FOGUETE", EM SEIS AMOSTRAS DE PLASMA .....	55
5 - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4 NO PLASMA DE INDIVÍ- DUOS NORMAIS E PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTI- CA, MEDIDOS POR IMUNOELEKTROFORESE "EM FOGUETE"	63
6 - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4 DE PACIENTES COM MO- LÉSTIA REUMÁTICA EM AMOSTRAS DE PLASMA DO 1º DIA E 3º MÊS .....	65
7 - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4 DE PACIENTES COM MO- LÉSTIA REUMÁTICA EM AMOSTRAS DE PLASMA DO 1º DIA E 6º MÊS .....	66
8 - VALORES DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO FRAGMENTO Ba DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA, MEDIDAS POR IMUNOELEKTROFORESE "EM FOGUETE" .....	69

9	-	DOSAGEM DE IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES EM INDIVÍDUOS DO GRUPO-CONTROLE E EM PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA, USANDO-SE O ENSAIO DO FATOR REUMATÓIDE MONOCLONAL E DA CONGLUTININA .....	76
---	---	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.R.	:	Artrite Reumatóide
ASO	:	Antiestreptolisina O
BTG	:	Tampão de Barbitol-Tris-Glicina
CH <sub>50</sub>	:	Complemento Hemolítico Total
CHCM	:	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
EDTA	:	Ácido Etilenodiaminotetracético
FRm	:	Fator Reumatóide Monoclonal
GGA	:	Gamaglobulina Agregada
G.N.A.P.E.	:	Glomerulonefrite Aguda Pós-Estreptocócica
HCM	:	Hemoglobina Corpuscular Média
HBs	:	Antígeno de Superfície do Vírus de Hepatite B
IC <sub>S</sub>	:	Imunecomplexos
K	:	Conglutinina
L.E.S.	:	Lúpus Eritematoso Sistêmico
M.R.	:	Moléstia Reumática
BBS	:	Tampão Borato
PCR	:	Proteína C-Reativa
PEG	:	Polietilenoglicol
PHN	:	Plasma Humano Normal
VCM	:	Volume Corpuscular Médio
VHS	:	Velocidade de Hemossedimentação
SHN-I	:	Soro Humano Normal Ativado por Inulina

## RESUMO

Já foi demonstrada a participação do sistema do complemento na patogênese da artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico. Na moléstia reumática, as evidências da participação do complemento são contraditórias e há poucos estudos que avaliam a participação das vias clássica ou alternativa nesta doença.

Procurando contribuir para o esclarecimento dessas dúvidas, foi elaborado o presente trabalho. Nesse sentido, foram estudados 24 pacientes com o diagnóstico de moléstia reumática em atividade, com seguimento posterior por 6 meses. A ativação da via clássica foi avaliada através da determinação dos índices C4d/C4 e a via alternativa, pela concentração no plasma do fragmento Ba. Ambas as determinações foram realizadas por imunoeletrodifusão quantitativa (imunoeletroforese "em foguete"). Quantificaram-se o complemento hemolítico total ( $CH_{50}$ ), pela técnica de Mayer, e os componentes C3 e C4 por imunodifusão radial. Mediu-se também a concentração de imunecomplexos circulantes, utilizando-se dois métodos, os radioimunoensaios da congutina e do fator reumatóide monoclonal.

Em comparação com o grupo-controle, tanto a via clássica ( $p < 0,001$ ) quanto a via alternativa ( $p < 0,02$ ) são ativadas na fase aguda da doença, fato demonstrado pelo estudo dos produtos

de degradação. CH<sub>50</sub>, C3 e C4 foram normais. Os níveis da relação C4d/C4 diminuíram no decorrer da evolução da doença ( $p < 0,01$ ), exceto nos pacientes com cardite grave. Os níveis do fragmento Ba não variaram significativamente no decorrer dos 6 meses. As mucoproteínas, a velocidade de hemossedimentação e a proteína C-reativa voltaram aos níveis normais com a evolução da doença, mesmo nos pacientes em que houve permanência de ativação do complemento. Na determinação de imunecomplexos circulantes, houve uma baixa positividade em nossos pacientes.

Demonstra-se haver ativação de ambas as vias do complemento, clássica e alternativa, na moléstia reumática aguda, constituindo um dos prováveis mecanismos mediadores da resposta inflamatória nesta doença.

## SUMMARY

Participation of the complement system has already been demonstrated in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.

In rheumatic fever data are controversial and there are only a few studies that evaluated the participation of the classic and alternative complement pathways in this disease.

The present study was carried out to assess the participation of the classic and alternative pathways in the pathogenesis of rheumatic fever. Twenty-four patients with acute rheumatic fever were studied for a period of six months. The activation of the classic complement pathway was by determination of the ratio C4d/C4, and of the alternative pathway by dosage of the fragment Ba, both determined by the rocket quantitative immunoelectrophoresis technique. The total hemolytic complement ( $CH_{50}$ ) was measured by Mayer's technique and C3 and C4 components by radial immunodiffusion. The concentration of circulating immune complexes was also measured by two methods: the conglutinin radioimmunoassays and monoclonal rheumatoid factor.

In comparison to the control group, both the classical ( $p < 0,001$ ) and the alternative ( $p < 0,02$ ) complement pathways are activated in the acute phase of the rheumatic fever, as demons-



trated by the degradation products study.  $CH_{50}$ , C3 and C4 were normal. The values of the ratio C4d/C4 decreased during the course of the disease ( $p < 0,01$ ), except for those patients with severe carditis. Ba fragment levels did not change significantly during the six-month period of follow-up. Erythrocyte sedimentation rate, mucoproteins and C-reactive protein became normal during the course of the disease, even in those patients in whom complement remained activated. Circulating immune complex levels were weakly positive in our patients. This study demonstrated that both classical and alternative complement pathways are activated in rheumatic fever. This activation may be one of the mediator mechanisms of the inflammatory response in this disease.

## I - INTRODUÇÃO

A moléstia reumática (M.R.) é uma complicação tardia, inflamatória, não-supurativa, que ocorre após uma infecção pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A de Lancefield<sup>1, 3-4, 13, 22, 25-26-27, 46-47, 77, 101, 103-104</sup>. De suas manifestações clínicas, a mais grave é a cardite, não só pela sua morbidade e mortalidade na fase aguda da doença, como pelas lesões orovalvares crônicas e progressivas que a ela se seguem. Nenhum sintoma, sinal ou teste laboratorial, isolado, é patognomônico da doença, embora várias combinações destes constituam seus critérios diagnósticos.

Embora um fator etiológico seja reconhecido na M.R., o mecanismo pelo qual uma infecção estreptocócica desencadeia todo o processo fisiopatológico, em especial a cardite, permanece obscuro. Interrogam-se, entre outros fatores, a presença de anticorpos anticorção<sup>37, 49-50-51, 68, 90, 123-124</sup>, a semelhança antigênica entre algum constituinte protéico do estreptococo e da fibra miocárdica<sup>48-49-50, 124</sup>, as funções imunes humoral<sup>37, 51, 95, 124</sup> e celular alteradas<sup>40, 61, 80-81, 86, 95, 118, 123-124</sup>.

Existem várias evidências de que a ativação do complemento possa estar envolvida na patogênese das lesões teciduais observadas em muitas doenças auto-imunes ou não, como no lúpus eritematoso sistêmico (L.E.S.)<sup>8, 53, 73, 93, 107</sup>, artrite reumatóide (A.R.)<sup>8-9, 52, 70, 74, 79, 88</sup>, glomerulonefrites<sup>59, 73, 96</sup>, doença do soro, urticária, vasculites, infecções bacterianas e parasitárias<sup>23, 98</sup>. Na M.R., entretanto, o conhecimento da patogênese de suas diferentes manifestações persiste incipiente e controverso<sup>48, 50, 95, 124</sup>. Há algumas razões para se pensar que a ativação deste sistema esteja envolvida na resposta inflamatória

da doença, tais como o encontro de baixos níveis de Clq, C3 e C4 no líquido sinovial<sup>106</sup> e a presença de imunecomplexos (ICs) circulantes<sup>32, 93, 119</sup>, na fase aguda da doença. Vários trabalhos têm procurado evidências destes fatos, com resultados contraditórios.

Pelo ainda escasso e controverso conhecimento fisiopatológico da doença e por sua freqüência persistir elevada em nosso meio, estudamos em pacientes portadores da M.R. aguda a participação do sistema do complemento, por quantificação dos produtos de degradação, C4d/C4<sup>63-64, 69</sup> e Ba<sup>8, 58, 63</sup>, que podem ser utilizados como indicadores "in vivo" de ativação das vias clássica e alternativa, respectivamente. Procuramos detectar sua correlação com as manifestações clínicas e provas laboratoriais de atividade inflamatória rotineiramente utilizadas como critérios diagnósticos e de atividade da doença. Com o seguimento dos pacientes por 6 meses, tentamos evidenciar se a resposta clínica ao tratamento se acompanhava de alteração da atividade do complemento.

Embora a M.R. não seja uma doença causada por imunecomplexos, procuramos determinar a sua participação nela, visto que a presença destes imunecomplexos, no soro de pacientes com M.R. aguda, já está bem documentada<sup>83, 119</sup>, inclusive em níveis equivalentes aos da glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica (G.N.A.P.E.)<sup>83, 96</sup>.

## II - MOLÉSTIA REUMÁTICA

## ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA MOLÉSTIA REUMÁTICA

A moléstia reumática (M.R.) é uma doença inflamatória, não-supurativa, que ocorre como seqüela de uma faringite por estreptococo beta-hemolítico do grupo A de Lancefield<sup>1, 3-4, 13, 22, 25, 27, 46-47, 77, 101, 103-104, 110, 115</sup>. Consiste clinicamente em um grande número de manifestações, que podem ocorrer simultaneamente ou em sucessão em cada paciente. A manifestação mais comum é a artrite; a mais séria é a cardite e a mais curiosa, a coréia de Sydenham. As manifestações mais raras e sem conseqüências são os nódulos subcutâneos e o eritema marginado. Embora o acometimento pela M.R. aguda seja autolimitado, as lesões das valvas cardíacas são crônicas e progressivas, levando à insuficiência cardíaca<sup>2, 16, 19, 22, 38, 78, 109-110</sup>.

Pacientes previamente acometidos por M.R. sofrem recorrências em até 5% dos casos em 1 ano, se não houver profilaxia adequada.

A M.R. é muitas vezes agrupada com a artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, etc., sob o título de "doenças difusas do tecido conectivo". Embora a M.R. possua características comuns com todas essas doenças, é também diferente delas, não apenas por suas características clínicas e histológicas distintas, mas também porque seu fator determinante específico é reconhecido. Nenhum sintoma, sinal ou teste laboratorial, isolado, é patognomônico de M.R., embora várias combinações deles sejam diagnósticas<sup>18, 91, 105</sup>.

A partir da década de vinte, a incidência de M.R. aguda vem diminuindo nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, a prevalência é alta, constituindo um problema de

saúde pública. Mesmo dentro dos países de melhor nível sócio-econômico, a doença ainda ocorre com maior frequência nas regiões mais pobres <sup>22, 25, 47</sup>.

A relação etiológica do estreptococo do grupo A de Lancefield com a M.R. pode ser resumida da seguinte forma: 1) numerosos estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram uma associação direta das infecções pelo estreptococo do grupo A com M.R.; 2) indicação de uma infecção estreptocócica prévia pode quase sempre ser demonstrada imunologicamente na fase aguda da M.R., através da elevação dos níveis de anticorpos contra antígenos estreptocócicos; 3) tanto o ataque primário quanto o secundário da doença podem ser impedidos por meio de tratamento imediato ou prevenção das infecções estreptocócicas com terapêutica antimicrobiana apropriada <sup>95, 103</sup>.

A via faríngea de infecção é necessária para iniciar o processo reumático, mas uma porcentagem relativamente pequena de indivíduos que sofrem de infecções estreptocócicas da garganta (0,5 a 3%) desenvolve subsequente M.R. <sup>103, 110, 115, 124</sup>.

O mecanismo de ação do estreptococo do grupo A de Lancefield permanece desconhecido e o microorganismo não é demonstrável nas lesões quando a M.R. aparece dias ou semanas após a faringite aguda. Nenhum produto do estreptococo foi incriminado como o causador das lesões, tanto na forma de ação direta do agente ou de suas toxinas agindo nos tecidos ou mesmo como antígeno induzindo hipersensibilidade <sup>31, 37, 95, 124</sup>.

As idéias iniciais na tentativa de entender a relação imunológica entre estreptococcia e M.R. partiram da similitude entre esta e a doença do soro: o papel imunogênico da infecção estreptocócica na M.R. ou da aplicação do soro na doença do so-

ro; o período latente; a fase de doença ativa. O principal se-  
nãõ desta teoria é a duração fixa do período latente, mesmo após  
várias crises de M.R.. Na doença do soro, o período latente en-  
tre a injeção de antígenos e as manifestações de hipersensibi-  
lidade progressivamente diminui, com os ataques subseqüentes.

Nos estudos realizados até o presente, através de obser-  
vações epidemiológicas, anatomopatológicas, clínicas e imunoló-  
gicas, a teoria que tem mais argumentos para explicar a fisiopa-  
tologia da M.R. é a teoria auto-imune, segundo a qual, as le-  
sões seriam consequência da resposta imune anormal do hospedei-  
ro ao estreptococo, ou de seus próprios tecidos antigenicamente  
alterados <sup>40, 51, 61, 80-81, 83, 86, 89, 95, 123 -124.</sup>

Segundo Scalla <sup>90</sup>, foram Brokman et alii, em 1937, os pri-  
meiros autores a relatarem a presença de anticorpos anticorção  
no soro de pacientes reumáticos, mediante o método de fixação de  
complemento. Nasceu, com esse trabalho, o conceito de auto-an-  
ticorpos como causa da doença. Kaplan et alii <sup>47-48</sup>, a partir de  
1958, demonstraram, ao estudarem apêndices atriais de pacientes  
em atividade reumática, a deposição maciça de imunoglobulinas e  
de complemento ligados às fibras miocárdicas. Em continuidade,  
diversos autores, numa sucessão de pesquisas, sugeriram forte-  
mente a implicação do mecanismo de auto-agressão na origem da  
doença, confirmando a existência de anticorpos anticorção <sup>68, 75,</sup>  
<sup>90, 124.</sup>

A função patogênica destes anticorpos reativos contra  
o músculo esquelético e cruzadamente com antígenos estreptocó-  
cicos é difícil de ser avaliada, com as informações disponíveis.  
Em animais de experimentação, ainda não se conseguiu reprodu-  
zir, durante a infecção por estreptococo, o desenvolvimento de



lesão cardíaca que corresponda integralmente à encontrada na cardite reumática.

O papel da imunidade celular na M.R. vem sendo suspeitado há muitos anos através de evidências de ordem clínica e experimental. A raridade com que ocorre a M.R. antes dos quatro anos de idade e o predomínio de infiltrado linfocitário nas lesões inflamatórias levaram à suspeita da participação da hipersensibilidade celular na sua patogênese<sup>71, 80, 124</sup>.

Em 1974, Read et alii<sup>80</sup> observaram resposta celular aumentada a certos antígenos da membrana celular estreptocócica em pacientes reumáticos, comparados com controles adultos normais e indivíduos com infecção estreptocócica não-complicada. Havia predomínio de linfócitos nas lesões inflamatórias e verificou-se, também, que os constituintes básicos celulares encontrados nos nódulos subcutâneos reumáticos, corpos de Aschoff ou em lesões valvares agudas são freqüentemente caracterizados por um predomínio de linfócitos. A possibilidade de que as reações imunológicas humorais e celulares na M.R. fossem secundárias à presença de uma população linfocitária anormal nestes pacientes, foi inicialmente explorada por Lueker et alii<sup>61</sup>, encontrando uma diminuição relativa de linfócitos T e um aumento dos linfócitos B do sangue periférico, na fase aguda da doença.

Sapru et alii<sup>89</sup> estudaram a imunidade celular em pacientes com cardiopatia reumática crônica e concluíram que as células T do sangue periférico desses pacientes estavam reduzidas e que os linfócitos exibiam transformação blástica aumentada em resposta a antígenos da membrana do estreptococo.

Reis et alii<sup>81</sup> sugeriram, através de seus modelos experimentais, que os macrófagos e os antígenos constituintes dos es-

treptococos do grupo A de Lancefield podem ter um papel importante na ativação das células T contra componentes do coração, durante infecção estreptocócica.

Estudando a quimiotaxia dos neutrófilos periféricos de pacientes com M.R. em fase aguda, Ronchi<sup>86</sup> demonstrou uma anormalidade humoral da resposta inflamatória destes pacientes, embora não tenha determinado o exato papel desta anormalidade no mecanismo fisiopatogênico da doença.

A possibilidade de um fator genético ter um papel na suscetibilidade para a moléstia reumática foi recentemente reinvestigada por Zabriski et alii<sup>125</sup>. A presença de dois anticorpos monoclonais contra aloantígenos de células B de pacientes com moléstia reumática mostrou-se positiva em 92% dos pacientes, sugerindo a existência de um marcador genético de suscetibilidade para esta doença.

A conclusão é de que não existe, ainda, um mecanismo patogênico único que explique, de forma conclusiva, as alterações múltiplas encontradas na M.R.. Prevenção primária, no momento, pode ser conseguida apenas por diagnóstico e tratamento precoces das estreptococcias.

### III - O COMPLEMENTO E IMUNECOMPLEXOS

## 1 - O SISTEMA DO COMPLEMENTO E VIAS DE ATIVAÇÃO

### 1.1 - O Sistema do Complemento

Em 1894, Pfeiffer relatou que a injeção intraperitoneal de vibriões coléricos em cobaias previamente imunizadas contra a cólera causava a lise (bacteriólise) dos mesmos<sup>14, 35, 85</sup>. Em 1898, Bordet relatou que este tipo de resultado era devido a duas substâncias distintas, uma específica para a bactéria contra a qual o animal tinha sido imunizado e outra, substância inespecífica, encontrada no soro fresco de muitos animais. Esta última era chamada de "alexina", até que Erlich a denominou de "complemento"<sup>14, 25, 98</sup>.

O sistema do complemento humano consiste em mais de 20 proteínas plasmáticas que são química, funcional e imunologicamente distintas. Sua principal função parece ser a de mediador e amplificador humoral das reações antígeno-anticorpo. A ação do sistema do complemento inclui a lise de células, a liberação de histamina dos mastócitos e plaquetas, o aumento da permeabilidade vascular, a contração da musculatura lisa, a quimiotaxia de leucócitos e a neutralização de certos vírus. A quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares no local de ativação do complemento é frequentemente um dos passos na formação de uma resposta inflamatória<sup>14, 23, 30, 35, 65, 85, 98, 100</sup>.

O sistema do complemento também está interligado com os sistemas de coagulação, fibrinolítico e de cininas<sup>20, 72, 87, 98</sup>.

Existem várias evidências de que a ativação do complemento possa estar envolvida na patogênese das lesões teciduais ob-

TABELA I - ENVOLVIMENTO DO COMPLEMENTO NAS DOENÇAS HUMANAS.

---

Doenças Alérgicas	{	Doença do soro Angioedema Urticária Asma brônquica
Doenças Hematológicas	{	Anemia hemolítica auto-imune Hemoglobinúria paroxística noturna Doenças causadas pelo frio Trombocitopenia imune
Doenças Gastrointestinais	{	Retocolite ulcerativa Enterite regional Fase prodrômica da Hepatite B
Doenças Renais	{	Glomerulonefrites
Doenças Dermatológicas	{	Pênfigo vulgar Dermatite herpetiforme Vasculite hipocomplementêmica Protoporfiria eritropoética
Doenças Reumatológicas	{	Lúpus eritematoso sistêmico Artrite reumatóide Moléstia reumática Granulomatose de Wegener Crioglobulinemia
Doenças Infecciosas	{	Hepatite B Rubéola Infecções bacterianas Infecções parasitárias

---

Tabela adaptada <sup>6, 23</sup>.

servadas em muitas doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico<sup>8, 64, 69, 73</sup>, artrite reumatóide<sup>8-9, 52, 64, 69-70, 74</sup>, as glomerulonefrites<sup>28, 59, 73, 96</sup> e muitas outras<sup>23, 63-64, 117</sup> (Tabela I).

O complemento está presente no soro de todos os animais homeotérmicos e seu título no soro não aumenta pela imunização. O complemento está presente no soro obtido de sangue recentemente colhido; é instável, mesmo em geladeira a 4°C, mas é preservado pelo congelamento a -70°C ou pela liofilização. Pode ser inativado pelo aquecimento a 56°C, por 30', pois certos componentes do complemento (C1, C2, C6, C8 e fator B) são termolábeis, enquanto os outros são termorresistentes. Os componentes do complemento são proteínas e movem-se na eletroforese, principalmente com as betaglobulinas, exceto por alguns componentes nas frações alfa ou gamaglobulinas (Tabela II)<sup>14,17,23,72,85,87</sup>.

À exceção de C3 (1 mg/ml de soro), os demais componentes são encontrados no soro em quantidades muito pequenas, na ordem de µg/ml.

De acordo com a nomenclatura, o complemento é designado pelo símbolo "C" e os seus componentes, por este símbolo seguido do número correspondente (Ex.: C1, C4, C3, etc.); ou no caso de certos componentes, por símbolos ou nomes convencionais - P (Properdina), fator B, fator D, etc.. As enzimas do complemento formadas durante o processo de ativação são designadas através de uma barra colocada sobre o símbolo da proteína ou complexo protéico, por exemplo  $\overline{C1s}$ ,  $\overline{C4b2a}$ , fator  $\overline{B}$ . A letra "i" no final do símbolo serve para designar o componente que perdeu a atividade, por exemplo C3bi = C3b inativado. Os fragmentos dos componentes que surgem através da clivagem enzimática são designados através de letras minúsculas que seguem o símbolo empregado

para o componente, como, por exemplo, C4a, C4b<sup>85, 87</sup>.

A maioria das proteínas individuais do sistema de complemento está normalmente presente na circulação sob a forma de moléculas precursoras, funcionalmente inativas. Cada componente do complemento precisa ser ativado seqüencialmente, sob condições apropriadas, para que uma reação do complemento progrida. Portanto, a ativação não é um acontecimento isolado e, sim, um processo dinâmico, que permite às proteínas tornarem-se membros interatuantes de um sistema funcionalmente integrado.

Os subcomponentes de C1, denominados de C1q, C1r, C1s, são mantidos juntos no soro por íons cálcio, mas podem ser separados por métodos de cromatografia (por ex.: filtração em gel).

Existem os fragmentos de baixo peso molecular de C3 e C5-C3a e C5a, respectivamente, que estimulam a liberação de histamina dos mastócitos. Esta propriedade recebe a denominação de "atividade de anafilatoxina"<sup>20, 72, 85</sup>.

Para que não ocorra uma ativação descontrolada do sistema do complemento, existem várias proteínas séricas que servem para modular e limitar a ativação do sistema do complemento, por exemplo o inativador de C1 (INA-C1). Estas proteínas ligam-se ou atacam enzimaticamente apenas as formas especificamente alteradas (Tabela II).

TABELA II - PRINCIPAIS PROPRIEDADES DOS COMPONENTES DO COMPLEMENTO E DE SEUS REGULADORES.

Componentes		Número de Cadeias	Peso Molecular Aproximado (Dáltons)	Mobilidade Eletroforética	Concentração Sérica Humana Aproximada (µg/ml)	Fragmentos
Nomenclatura	Sinônimos					
<u>Via Clássica</u>						
Clq		18	400.000	γ2	70	
Clr		2	190.000	β	34	
Cls	Cl esterase	1	85.000	α2	31	
C2		1	117.000	β2	30	C2a, C2b
C3	β1C	2	180.000	β1	1.200	C3a, C3b, C3c C3d, C3e
C4	β1E	3	209.000	β1	400	C4a, C4b, C4c C4d
C5	β1F	2	185.000	β1	85	C5a, C5b
C6		1	128.000	β2	75	
C7		1	121.000	β2	55	
C8		3	153.000	γ1	80	
C9		1	79.000	α	160	

continua



Componentes		Número de Cadeias	Peso Molecular Aproximado (Dáltons)	Mobilidade Eletroforética	Concentração Sérica Humana Aproximada (µg/ml)	Fragmentos
Nomenclatura	Sinônimos					
<u>Via Alternativa</u>						
Properdina		4	190.000	γ2	25	
Fator B	PA,C3PA,GBG	1	93.000	β2	200	Ba, Bb
Fator D	PA-ase,C3PA-ase GBG-ase	1	25.000	α	2	
<u>Reguladores do complemento</u>						
Inativador de C1 (inibidor de C1 esterase) INI-C1s		1	105.000	α2	180	
Inativador de C3b (INA-C3b)		2	88.000	β2	35	
B1-H (Acelera- dor do inativa- dor de C3b)		1	150.000	β1	360	
C4-bp(proteína de ligação em C4)		-	590.000	β2	-	
Proteína S		-	-	-	7.300	
Carboxipeptidase N		-	-	-	-	
C3b		2	170.000	-	-	

Tabela adaptada 6, 17, 20, 72, 87.

## 1.2 - Vias de Ativação do Complemento

Existem dois mecanismos básicos ou vias que levam à ativação da porção terminal da sequência de complemento. Estes mecanismos de ativação, denominados "Via Clássica" e "Via Alternativa", são desencadeados por agentes diferentes, cada um envolvendo vários passos de reação<sup>6, 20, 35, 87, 98</sup>. As duas vias de ativação convergem a meio caminho no sistema do complemento e o restante da sequência da reação, envolvendo as reações de C5b até C9, é comum a ambas as vias (Fig. 1). A porção terminal da sequência do complemento também pode ser ativada diretamente por certas enzimas celulares e séricas que fazem parte do complemento, sem que haja, portanto, participação de fatores iniciais da reação. Dentre elas, estão as enzimas fibrinolíticas (plasmina) e certas enzimas lisossômicas, capazes de ativar C3 ou C5 diretamente.

### 1.2.1 - Via Clássica do Complemento

A via clássica pode ser ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e por imunoglobulinas agregadas (Tabela III).

As imunoglobulinas humanas que pertencem às subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e à classe IgM são capazes de iniciar a via clássica. Esta propriedade não é compartilhada pela subclasse IgG4 e pelas classes IgA, IgD e IgE. Dentre as subclasses de IgG, a IgG3 é a mais ativa. A ativação imunológica do complemento C1 ocorre após sua fixação a um sítio localizado na região Fc

TABELA III - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.

<u>Via Clássica</u>		<u>Via Alternativa</u>
Imunológicas	IgM IgG (Subclasses 3,1,2)	IgA, IgG4, IgE
Não-Imunológicas	Proteína A estafilocócica	Lipopolissacarídeos
	Proteína C-reativa	Polissacarídeos de plantas e bactérias
	Enzimas proteolíticas (calicreína, plasmina, tripsina, etc.)	Fator da peçonha de naja
	ADN	Hemácias de coelho

Tabela adaptada <sup>6, 20</sup>.

TABELA IV - ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO COMPLEMENTO.

VIA	COMPOSIÇÃO	SUBSTRATO NATURAL
<u>Clássica</u>		
Cl esterase	$\overline{C1s}$	C4 e C2
Convertase de C3 da via clássica	$\overline{C4b2a}$	C3
Convertase de C5 da via clássica	$\overline{C4b2a3b}$	C5
<u>Alternativa</u>		
Fator D	$\overline{D}$	Fator B
Convertase de C3 da via alternativa	$\overline{C3bBb}$	C3
Convertase lábil de C5	$\overline{C3bBbC3b}$	C5
Convertase estável de C5	$\overline{C3bBbC3bP}$	C5

Tabela adaptada <sup>6</sup>.

da molécula de imunoglobulina.

A via clássica também pode ser ativada não-imunologicamente por várias substâncias quimicamente diversas (Tabela III).

Há uma seqüência de interações enzima-substrato e proteína-proteína que levam à formação seqüencial de várias enzimas do complemento (Tabela IV).

C1 consiste de três moléculas protéicas distintas, denominadas C1q, C1r e C1s, que estão unidas entre si por uma ligação cálcio-dependente, formando um agregado macromolecular. C1 ativado assume a próxima fase da reação do complemento: formação da enzima-chave da via clássica do complemento  $\overline{\text{C4b2a}}$  (Fig. 1). Este complexo é formado a partir de suas moléculas precursoras, enzimaticamente inativas, C4 e C2.

C4 é composto de três cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ <sup>20, 64, 69, 72</sup>, com pesos moleculares de 93.000, 78.000 e 33.000, respectivamente. C1 cliva uma ligação peptídica localizada na maior das três cadeias, a cadeia alfa, com liberação de um fragmento menor C4a, que é liberado para o soro, e outro maior C4b, que se liga à superfície da membrana celular. C4b é clivado e inativado pelo inativador de C3b (INA-C3b) e o cofator C4-pb. A molécula de C4b subsequente se dissocia em fragmentos imunologicamente distintos, C4c e C4d. O papel de C4-pb e INA-C3b na clivagem de cadeia alfa de C4b ainda não está bem esclarecido<sup>34</sup>. A reação não ocorre se C4-pb e INA-C3b forem omitidos. Como C4d permanece na fase fluida da circulação por mais tempo, sua quantificação no plasma de pacientes pode ser utilizada como um indicador "in vivo" de ativação da via clássica<sup>9, 64</sup>.

De modo semelhante, a clivagem de C2 por  $\overline{\text{C1s}}$  gera um fragmento menor, C2b, e outro maior, C2a. Há então a formação de

um complexo molecular (PM=280.000), composto por 2 subunidades,  $\overline{C4b2a}$ . Este complexo molecular é uma enzima proteolítica que assume o papel de continuar uma reação de complemento em evolução, não sendo mais necessários os compostos iniciais da reação após a sua formação. O complexo  $\overline{C4b2a}$  também é denominado "convertase de C3", que cliva, ativando o próximo componente de sequência, o C3, em dois fragmentos, sendo o menor o C3a. Um sítio de ligação lábil fica exposto no fragmento maior C3b, permitindo que esta molécula se ligue às membranas em sítios próximos, mas distintos daqueles utilizados pelo anticorpo e por  $\overline{C4b2a}$ . A ligação de C3b à molécula  $\overline{C4b2a}$  leva à geração da última enzima da via clássica,  $\overline{C4b2a3b}$ . Esta enzima possui um substrato natural, C5, que é cindido em C5a e C5b. Este último é ligado a C6, C7, C8 e C9, causando a lise de hemácias, bacteriólise ou destruição citotóxica de células e tecidos (Fig. 1). A via clássica pode ofertar substrato (C3b) para a ativação da via alternativa. Este mecanismo é chamado "alça de amplificação" <sup>17, 67, 72, 96</sup>.

### 1.2.2 - Via Alternativa do Complemento

A via alternativa do complemento, ou a via da properdina, pode ser ativada imunologicamente pela IgA humana e também por IgG4 e IgE (Tabela III). Esta via também pode ser prontamente iniciada, não-imunologicamente, por certos polissacarídeos complexos, lipopolissacarídeos e enzimas tipo tripsina e alguns tipos de imunocomplexos (Tabela III). A adição de certos polissacarídeos, tais como o zimosan, inulina ou de bactérias gram-negativas, ao soro de animais congenitamente deficientes de C4 ou C2 leva à clivagem de C3 e à ativação da sequência terminal por um mecanismo independente da via clássica<sup>6, 20, 30, 35, 87</sup>.

Os componentes da via alternativa incluem o fator D, fator B, properdina e C3. Beta-1H e inativador de C3b (INA-C3b) são proteínas de controle da ativação da via alternativa do complemento (Tabela II).

Como na via clássica, o resultado imediato da ativação da via alternativa é desenvolver enzimas que clivem C3 e C5, iniciando a sequência do complexo de ataque à membrana, que é comum a ambas as vias.

Antes de descrevermos a cadeia de reações bioquímicas que compõe a via alternativa, convém descrever algumas funções e propriedades de cada molécula envolvida neste sistema.

O fator B (pró-ativador de C3)<sup>8, 20, 58, 66, 87</sup> é uma glicoproteína com peso molecular aproximado de 93.000, termolábil, com mobilidade eletroforética na região beta, composta apenas de uma cadeia polipeptídica. Sua concentração no soro humano normal, onde existe na forma de pró-enzima, é aproximadamente de 200 µg/ml. A proteína é sintetizada por macrófagos e por lin-

fócitos. Sob ação enzimática, é clivada em dois fragmentos, denominados Bb e Ba. O fragmento Ba tem um peso molecular de 33.000 e migra como uma alfa globulina; o fragmento Bb tem um peso molecular de 60.000 e tem a mobilidade eletroforética de uma gama globulina (Tabela II). O fragmento Bb forma com C3b a enzima mais importante da via alternativa, o complexo  $\overline{C3bBb}$ , ou convertase de C3 (Tabela IV).

O fator D (convertase do pró-ativador de C3) <sup>8, 20, 57, 66-67, 97</sup> é a enzima que age sobre o fator B e existe no organismo já em forma ativada (Tabela IV). Tem peso molecular aproximado de 24.000 e mobilidade eletroforética no soro de uma alfa globulina. Sua concentração sérica é extremamente pequena, em torno de 2 µg/ml. O fator  $\overline{D}$  converte o complexo bimolecular, C3bB na enzima ativa,  $\overline{C3bBb}$ , pela clivagem do fator B (Fig. 1).

O componente C3<sup>8, 20, 39, 66, 87</sup>, do complemento, faz parte de ambas as vias de ativação do complemento. É uma glicoproteína de peso molecular aparente de 180.000, uma beta globulina, composta de duas cadeias polipeptídicas. C3 é sintetizado no fígado e também por macrófagos e monócitos. Existe no soro na forma de pré-enzima, que, ao ser clivada, dá origem a dois fragmentos, C3a e C3b. Este último vai unir-se com o fragmento Bb, formando  $\overline{C3bBb}$ , ou convertase de C3, a enzima que cliva novas moléculas de C3 nativo. C3 é a proteína do sistema do complemento que ocorre com maior concentração no soro (1.200 µg/ml). Os fragmentos gerados pela ativação de C3 têm várias atividades biológicas <sup>8, 72</sup>.

Properdina <sup>8, 20, 66, 87</sup> é uma das proteínas reguladoras da via alternativa do complemento. Sua principal função parece ser a de estabilizadora da convertase de C3 e de C5. É uma glico-

proteína com mobilidade eletroforética em gama-2, não sendo essencial nesta via.

Beta-1H <sup>8, 20, 66, 87</sup> é uma glicoproteína que exerce ação controladora através de, pelo menos, dois mecanismos: inibição da formação da convertase de C3 da via alternativa e inativação de C3b, em conjunto com INA-C3b. Este complexo molecular é uma glicoproteína que age sobre C3b, produzindo C3bi.

Uma vez ativada a via alternativa, pela clivagem de C3, formando C3b, este ligar-se-ia a uma molécula de fator B, que, na presença de íons magnésio, formaria um complexo bimolecular, C3B, ainda sem atividade enzimática. Quando em complexo com C3b, entretanto, o fator B torna-se suscetível à clivagem enzimática por fator  $\bar{D}$ , resultando na formação de C3 da via alternativa,  $\overline{C3Bb}$ , com liberação do fragmento Ba. Convertase de C3 ( $\overline{C3bBb}$ ) é um complexo instável em solução. Sua estabilidade é influenciada positivamente por properdina e negativamente por Beta-1H e INA-C3b. Em condições fisiológicas, a convertase de C3 da via alternativa do complemento é mantida em baixas concentrações no organismo, devido à ação dessas proteínas reguladoras. A convertase de C3 da via alternativa pode tornar-se convertase de C5 pelo recrutamento de um fragmento C3b adicional, que passa a suprir uma ponte de ligação ao substrato, C5. Assim como a convertase de C5 da via clássica, a ação enzimática de C5 convertase de via alternativa de complemento cliva C5 em C5a e C5b, dando origem ao primeiro componente do complexo multimolecular, que é complexo de ataque de membrana, C5b-C9, via terminal comum (Fig. 1) <sup>6, 30, 72, 87</sup>.



# VIA CLÁSSICA

ATIVADORES

C1

C1  
C2 C4  
C4b2a

Convertase  
de C3

C3

C3b

C4b2a3b

Convertase  
de C5

# VIA ALTERNATIVA

ATIVADORES

C3 ou C3b B

"Alça de  
amplificação"  
+C3b

Mg<sup>+</sup> D

C3bBb

Convertase de C3

C3bBbC3b

Convertase lábil  
de C5

(P) Properdina

C3bBbC3P

Convertase estável  
de C5

ATIVAÇÃO DE C5 (Via comun)  
C6, C7, C8, C9

FIGURA 1 - Diagrama dos mecanismos de ativação "em cascata" do sistema complemento (Vias de Ativação).

### 1.3 - Métodos de Avaliação do Complemento

Determinação dos valores do complemento pode ser útil no diagnóstico, na avaliação de atividade da doença, no estudo de seus mecanismos fisiopatológicos e no tratamento. Os níveis séricos do complemento dependem do balanço síntese-catabolismo dos vários componentes do complemento <sup>72</sup>.

Existem vários métodos usados para a avaliação da utilização do complemento, exigindo todos eles certas precauções para impedir que o complemento perca sua atividade pelo manuseio inadequado <sup>17, 85, 102</sup>.

A atividade do complemento é geralmente medida pela sua capacidade de lisar hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos de coelho anti-hemácias de carneiro (hemolisinas). A titulação do complemento nesta reação fornece a medida geral da integridade da via clássica do complemento e do mecanismo de ataque à membrana. Os valores são expressos em unidades hemolíticas, indicando a maior diluição do soro que é capaz de provocar 50% de lise das hemácias ( $CH_{50}$ ). A atividade hemolítica normal depende de uma concentração ótima de todos os principais componentes, C1-C9. Se a concentração de um dos componentes está muito reduzida ou ausente, pouca ou nenhuma atividade hemolítica é detectada. A medida de  $CH_{50}$  requer reagentes que, por vezes, não são disponíveis rotineiramente em laboratórios e, além do mais, esta técnica é de difícil padronização <sup>17, 62, 85, 102</sup>.

Vários componentes do complemento podem ser individualmente quantificados no soro ou em outros fluidos do organismo através de imunodifusão radial simples em ágar <sup>17, 85, 102</sup>. A extensão do halo de precipitação de um antígeno no ágar contendo

anticorpo específico é proporcional à concentração do antígeno. Existem placas de imunodifusão radial no comércio contendo anticorpos para C3, C4 e fator B, por exemplo. Todos os componentes do complemento que possuam níveis séricos acima de 20 µg/ml, aproximadamente, e para os quais existe um anti-soro, podem ser medidos por esta técnica. Este método, porém, não diferencia as moléculas ativas do complemento, das inativas. Existem, também, outros métodos não-quantitativos que mostram elevação do complemento<sup>102</sup>. Certos componentes do complemento são prontamente distinguíveis, devido à modificação da mobilidade eletroforética após sua clivagem. O complemento, também, pode ser demonstrado em lesões teciduais, através do emprego de imunofluorescência<sup>93, 107, 112</sup>. Uma evidência direta da utilização do sistema de complemento "in vivo" pode ser obtida através do estudo do catabolismo de componentes "radiomarcados" do complemento<sup>52</sup>.

#### 1.3.1 - Métodos de Avaliação da Via Clássica do Sistema Complemento

Através da dosagem da concentração de componentes do complemento, como Clq e C4, níveis baixos indicam ativação do complemento por intermédio da via clássica<sup>23, 64, 69, 106</sup>.

Recentemente, muitas técnicas capazes de detectar a utilização do complemento "in vivo" foram descritas<sup>8, 9, 17, 23, 63-64, 69, 79</sup>.

A ativação de C4 "in vivo" tem sido quantificada com técnicas imunoquímicas que detectam fragmentos polipeptídicos de C4 produzido durante a ativação<sup>9</sup>. É usada a imunoeletroforese

em gel contendo anticorpos que precipitam C4 nativo, assim como C4d (imunoeletroforese "em foguete")<sup>9, 63-64, 69</sup>, como meio de detectar ativação de C4. O C4 nativo no plasma produz uma simples linha de precipitação após a imunoeletroforese "em foguete". Quando o plasma contém C4d, duas linhas de precipitação aparecem, correspondendo a C4d e C4. A imunoeletroforese "em foguete" para C4d e C4 é um método simples e sensível de detecção da ativação de complemento para a via clássica em plasma humano, e tem sido usada para o estudo de ativação do complemento no plasma obtido de pacientes com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças<sup>9, 63-64, 69</sup>.

### 1.3.2 - Métodos de Avaliação da Via Alternativa do Sistema Complemento

Os métodos existentes para a avaliação do complemento pela via alternativa correspondem a provas qualitativas, semiquantitativas e quantitativas. Entre os métodos qualitativos, destacam-se aqueles que evidenciam a presença de produtos de clivagem do fator B pela imunoeletroforese-padrão em amostras de plasma e outros fluidos biológicos<sup>8, 39</sup> e a contra-imunoeletroforese<sup>5, 8</sup>. O achado de componentes da via alternativa por imunofluorescência em tecidos lesados também é uma demonstração qualitativa de utilização do complemento em patologia<sup>93, 112, 121</sup>. A imunoeletroforese cruzada pode ser considerada uma prova semiquantitativa e baseia-se na demonstração de produtos de degradação do fator B<sup>8</sup>.

Existem métodos quantitativos para avaliação da ativação

do complemento pela via alternativa. Perrin et alii<sup>73</sup> descreveram, em 1975, uma técnica para medir a concentração de fragmentos Ba no plasma por imunodifusão radial, utilizando dois tipos de anticorpos. Para isso, era necessário tratar a amostra do plasma com polietilenoglicol (PEG), que precipita do plasma o fator B nativo e seu produto de clivagem maior, o fragmento Bb. Quando Balla et alii<sup>8</sup> tentaram aplicar esta técnica, tiveram dificuldades com a reprodutibilidade (precisão do método). Método semelhante a este, mas para medir C3d, foi apresentado na mesma publicação e tem tido melhor aceitação, sendo utilizado em vários trabalhos na literatura recente<sup>8, 66, 74, 113</sup>. Várias técnicas quantitativas são baseadas na mensuração dos níveis de fator B nativo no plasma. Estas técnicas baseiam-se no fato de que o fator B é consumido por clivagem durante a ativação do complemento pela via alternativa e, realmente, são muito úteis quando existe ativação maciça do complemento por esta via. Na maioria das situações clínicas, porém, existe um consumo menos intenso de fator B e o nível não diminui além do limite mínimo da normalidade. Como a síntese do fator B está freqüentemente aumentada em processos inflamatórios<sup>94</sup>, essas técnicas perdem muito sua utilidade.

Os métodos usuais para medir os níveis de fator B são reações de precipitação em gel, tais como a imunodifusão radial<sup>8, 45</sup>, imunoeletroforese "em foguete"<sup>56, 99</sup> e as provas funcionais hemolíticas, como as realizadas com hemácias de coelho<sup>76</sup>.

Outra maneira de avaliar quantitativamente a ativação da via alternativa é injeção de fator B humano purificado e marcado com radioisótopo, acompanhando o desaparecimento dele na circulação e aparecimento de produtos finais do metabolismo dessa

proteína na urina<sup>102</sup>. Estes estudos metabólicos são, talvez, os índices mais fiéis de ativação da via alternativa de que se dispõe. Possuem, contudo, inconvenientes como apresentarem risco de radioatividade, terem custo elevado, serem de difícil realização e não poderem ser repetidos constantemente no mesmo indivíduo.

Balla<sup>8</sup> estudou uma técnica de quantificar o fator B e seus produtos de degradação como um indicador de ativação da via alternativa do complemento. Verificou, pela imunoeletroforese "em foguete", que, para detectar Ba em soro ativado por inulina, eram necessárias quantidades muito grandes deste fragmento no plasma. Inclusão da etapa de precipitação com o polietilenglicol resultou em um aumento considerável da sensibilidade do método, a ponto de torná-lo uma arma útil para investigação clínica. A aplicabilidade do teste de imunoeletroforese para estudos clínicos foi testada em várias doenças<sup>8, 52, 63-64</sup>.

## 2 - IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES

### 2.1 - Introdução

Imunecomplexos <sup>36, 54, 128</sup> são geralmente formados "in vivo", quando anticorpos são produzidos contra antígenos liberados de microorganismos ou de células do hospedeiro no fluido extracelular. Esse processo geralmente não leva à evidência de manifestações patológicas, mas exerce um papel fisiológico, levando à eliminação do antígeno e favorecendo a conclusão da resposta imunológica. Imunecomplexos ocorrem freqüentemente durante doenças infecciosas e em associação com doenças auto-imunes; porém, manifestações decorrentes de imunecomplexos são raras.

O depósito de imunecomplexos em tecidos pode provocar lesões que hoje são apontadas como a origem de um número crescente de estados patológicos. Os imunecomplexos podem ser formados localmente, "in situ", como na reação de Arthus, ou, ao contrário, aparecer sob a forma de complexos circulantes pré-formados. O modelo mais clássico de doenças por imunecomplexos circulantes é a doença do soro ou "doença aguda por imunecomplexos".

### 2.2 - Propriedades Biológicas dos Imunecomplexos

As propriedades biológicas dos imunecomplexos são dependentes da molécula do antígeno e/ou dos anticorpos numa forma agregada e, portanto, de uma densidade maior do que as moléculas livres correspondentes. As formas agregadas são mais facilmente ligadas pelos receptores celulares ou humorais do que as

isoladas. Os efeitos biológicos dos imunecomplexos são determinados inicialmente por uma interação com células ou com o sistema do complemento. A ligação dos imunecomplexos ao primeiro componente do sistema de complemento e, particularmente, ao seu constituinte Clq, pode levar à ativação daquele sistema e seus mecanismos efetores.

A maioria dos imunecomplexos que aparecem no sangue são rapidamente fagocitados pelo sistema fagocitário mononuclear, particularmente pelas células de Kùpffer. Somente pequenos complexos persistem por algum tempo. Existe uma eliminação fisiológica de imunecomplexos que pode representar um mecanismo de rápida retirada de antígenos. Algumas vezes, pequenas quantidades destes imunecomplexos podem ser fixadas nos vasos ou filtradas através de membranas, tais como as dos glomérulos renais ou placas coróides. Já os imunecomplexos formados no espaço extracelular não são eliminados tão rapidamente e podem induzir um foco inflamatório. As consequências biológicas dependerão de sua concentração, sua persistência e cronicidade na formação<sup>36</sup>.

### 2.3 - Demonstração de Imunecomplexos em Doenças Humanas

Dois recursos principais têm sido utilizados para demonstrar a ocorrência de imunecomplexos em doenças humanas. A primeira, o exame dos tecidos, e a segunda, a análise sorológica de amostras de fluidos biológicos<sup>54-55, 127</sup>.

A detecção de imunecomplexos nos tecidos é feita pelos estudos biológicos e histológicos, através de técnicas imunológicas, imunofluorescentes e pela microscopia eletrônica, que



pode levar à suspeita do envolvimento de imunecomplexos na observação de lesões, com base nas semelhanças com as induzidas experimentalmente por imunecomplexos. Como exemplo, temos as características morfológicas da glomerulonefrite por imunecomplexos, tão bem definida através de estudos com modelos animais, por Dixon<sup>28</sup>.

Os estudos sorológicos na detecção de imunecomplexos têm se desenvolvido muito nos últimos anos, mostrando associações evidentes de imunecomplexos com doenças, pela determinação de imunecomplexos em vários líquidos biológicos ou, indiretamente, pela demonstração de mudanças sorológicas que estão frequentemente associadas com a formação de imunecomplexos<sup>55</sup>. A detecção de imunecomplexos nos fluidos biológicos não indica necessariamente que a doença em estudo resulte desses imunecomplexos. Seriam necessárias sua demonstração nos tecidos lesados e a relação causal entre sua deposição textural e o aparecimento da lesão.

A determinação da presença e do nível de imunecomplexos é utilizada como critério diagnóstico para várias doenças, como estimativa da sua severidade, como índice para controlar os resultados do tratamento em pacientes com doenças por imunecomplexos e como meio de pesquisa na investigação da base patogênica das doenças imunológicas. Uma variedade de métodos tem sido desenvolvida, tendo como objetivos possuir o máximo de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade e de ser uma técnica simples para permitir seu emprego como teste de rotina<sup>17, 55</sup>.

## 2.4 - Significado Clínico da Detecção de Imunecomplexos em Doenças

Os imunecomplexos podem aparecer em uma variedade de condições clínicas<sup>36, 83, 106, 113, 119, 126-127</sup>. Há evidências de que, em algumas condições clínicas, como no lúpus eritematoso sistêmico, os imunecomplexos circulam em grandes quantidades e sua presença parece estar relacionada com suas principais manifestações. Existe ativação do sistema do complemento, que é manifestado pela queda dos níveis séricos de muitos componentes e pelo aparecimento de produtos de degradação do complemento no plasma. Verificou-se uma significativa correlação entre os níveis de imunecomplexos e a concentração do fragmento C3d no lúpus eritematoso sistêmico<sup>54, 73</sup>. Há, também, uma excelente correlação entre os níveis de imunecomplexos circulantes e C3d na artrite reumatóide, com o desenvolvimento de vasculites e outras manifestações extra-articulares<sup>54, 70, 128</sup>.

## 3 - IMUNECOMPLEXOS NA MOLÉSTIA REUMÁTICA

A moléstia reumática assemelha-se muitas vezes, sob o ponto de vista clínico, à doença do soro (doença por hipersensibilidade mediada por imunecomplexos), levando alguns autores a acreditarem que o mecanismo lesional dessa doença poderia ser postulado para a moléstia reumática. Diversos autores ocuparam-se com esta hipótese, mas há dados que, transferidos para a M. R., limitam o entendimento completo de sua patogenia, considerando-se apenas o mecanismo de lesão por imunecomplexos. Assim,

por exemplo, enquanto na doença do soro as taxas de complemento sérico são invariavelmente baixas, na crise aguda da moléstia reumática estão geralmente normais ou até elevadas. A doença do soro pode seguir-se a uma injeção de uma variedade de antígenos, enquanto, na M.R., segue exclusivamente a infecção por estreptococos do grupo A de Lancefield. O período de latência entre a infecção estreptocócica e a eclosão da doença é mais ou menos constante, diferente da doença do soro recorrente, onde fica mais curto progressivamente.

Svartman et alii<sup>106</sup>, em estudos a respeito dos níveis de complemento no líquido sinovial de portadores de M.R., demonstraram que as frações de Clq, C3 e C4 estavam baixas. Estes achados são altamente sugestivos de indução de artrite por imunecomplexos, os quais, sabidamente, consomem complemento.

Van de Rijn et alii<sup>83</sup> estudaram os níveis de imunecomplexos circulantes em pacientes com M.R. aguda e em pacientes com glomerulonefrite difusa aguda pós-estreptocócica durante o período de até seis meses. Utilizando o ensaio do Clq em fase sólida, obtiveram 81% (29 em 36) de positividade na M.R. e no ensaio de células Raji obtiveram 89% (17 em 19) de positividade. Ambos os grupos de pacientes tinham os níveis elevados de imunecomplexos, durante a fase aguda, e mostraram declínio lento dos níveis nos seis meses de observação.

Também Williams et alii<sup>119</sup>, utilizando os dois métodos, detectaram imunecomplexos circulantes em 90% e 75% dos pacientes com cardite reumática e em 100% e 88% dos pacientes com coréia de Sydenham, pelos mesmos métodos.

Estudos com imunofluorescência, realizados por Kaplan et alii<sup>48-49</sup>, demonstraram depósitos de imunoglobulinas e comple-

mento no miocárdio, pericárdio e endocárdio de pacientes falecidos em consequência de cardite aguda ou que se submeteram à comissurotomia. Os resultados dos trabalhos que mostraram uma elevada quantidade de imunecomplexos circulantes, no soro de pacientes com moléstia reumática aguda, são compatíveis com os achados de Kaplan et alii<sup>48-49</sup>, mas ainda não explicam como ou por que os IC<sub>s</sub> podem ser depositados nas valvas e em outros tecidos agudamente envolvidos. A natureza de tais depósitos, se imunes ou não, é desconhecida.

Aspectos histológicos e imunopatológicos do eritema marginado foram estudados por Ueki et alii<sup>112</sup>, demonstrando, através de imunofluorescência direta, a presença de C3 nas junções dermo-epidérmicas e nas papilas dérmicas, mas sem evidências de imunoglobulinas. Ressaltaram aqueles autores a presença de imunecomplexos circulantes demonstráveis naquela circunstância. Com base nos presentes dados, não se pode decidir se a presença de C3 intradérmico representa imunecomplexos ou se a deposição ocorre por ativação da via alternativa, independentemente de anticorpo.

A revisão da literatura, portanto, deixa claro que há formação de imunecomplexos circulantes, que há deposição textural de anticorpo e complemento. Não sabemos se esses achados têm significado etiopatogênico ou se são consequência inocente de outros fenômenos lesivos. Existe evidência na literatura de que a via clássica possa estar envolvida, mas os dados disponíveis sobre a via alternativa são escassos e sugerem que esta via tenha papel secundário.

#### 4 - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NAS DOENÇAS REUMÁTICAS

Como vimos, o complemento é um sistema biológico multi-molecular, cuja função principal é ser mediador e amplificador humoral das reações antígeno-anticorpo. Quando o complexo é ativado, uma série de funções são ativadas em consequência da liberação de produtos da reação do complemento. Uma das ações biológicas do complemento que só aparece após a ativação do sistema é a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares para o local da ativação. Este é, freqüentemente, um dos passos na formação de uma resposta inflamatória.

Quando dizemos que o complemento tem participação no processo inflamatório de uma doença humana, podemos afirmar apenas que há uma associação entre o processo inflamatório e a ativação do complemento, pois não sabemos até que ponto as lesões que observamos são decorrentes primariamente da ação do complemento ou de outros sistemas mediadores da inflamação, como leucotrienos, imunidade celular, etc..

Pelo exposto, fica claro que existem pelo menos duas vias bioquímicas de ativação do complemento: a via clássica e a via alternativa. A via clássica pode ser ativada pela reação antígeno-anticorpo e a via alternativa, por produtos bacterianos, tais como as endotoxinas.

Existem doenças, como, por exemplo, a púrpura de Schönlein-Henoch e a glomerulonefrite por IgA, onde a via principal de ativação é a via alternativa (Balla et alii, em preparação). Em outras enfermidades como o angioedema hereditário, apenas a via clássica está envolvida. Na maioria das doenças estudadas, incluindo a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico,

ambas as vias estão envolvidas.

Sobre a artrite reumatóide, o primeiro estudo do complemento foi realizado em 1937 por Rachmilewitz & Silverstein <sup>79</sup>, quando as técnicas para detectar o consumo do complemento ainda não estavam padronizadas. A ativação do sistema do complemento em articulações de pacientes com A.R. está bem documentada: a) por estudos em que se detectou a deposição de complemento no tecido sinovial <sup>74, 84</sup>; b) pela presença de imunecomplexos intra e extracelulares nas cavidades sinoviais <sup>74, 127</sup>; pelo decréscimo da quantidade de complemento sérico, apesar do aumento da síntese desses componentes pela sinovial <sup>86</sup>; d) pelo catabolismo aumentado de C4 e fator B, como demonstrado por estudos de metabolismo de proteínas marcadas <sup>52</sup>. Estes estudos mostraram, também, que a ativação do complemento na A.R. pode decorrer pela via clássica, como pela via alternativa do complemento <sup>52, 73-74</sup>.

No lúpus eritematoso sistêmico, estudos imunoquímicos têm demonstrado a deposição de C3 ou outros componentes nos glomérulos renais comprometidos pela doença <sup>53</sup> e na junção dermo-epidérmica <sup>107</sup>. Níveis séricos deprimidos de C1, C2, C3, C4 e C5 foram demonstrados em fases de atividade clínica da doença ou, mesmo, precedendo surtos de exacerbação. Níveis séricos baixos de complemento podem ser devidos a aumento no catabolismo, como já foi demonstrado para C3 <sup>45</sup>. A diminuição do complemento observada poderia resultar da ativação do complemento por imunecomplexos na circulação, ou depositados em tecidos, ou da ativação de complemento por anticorpos que reagem com antígenos celulares. Produtos de ativação do complemento no L.E.S. podem ser detectados na circulação <sup>5, 44, 73</sup> e em outros fluidos biológicos <sup>8</sup>.

Apesar de a ativação do sistema complemento em L.E.S.

ocorrer primariamente pela via clássica do complemento, existe uma ativação considerável da via alternativa também, como pode ser demonstrado por níveis baixos de fator B e properdina em alguns pacientes<sup>45</sup> pela presença de produtos de clivagem de fator B<sup>8, 73</sup>, pela localização glomerular de fator B e properdina<sup>121</sup>.

## 5 - ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NA MOLÉSTIA REUMÁTICA

Enquanto o papel do complemento tem sido investigado em muitas outras doenças reumatológicas, na moléstia reumática o seu conhecimento é muito incipiente.

A princípio, não havia entre os autores um acordo sobre os níveis de complemento sérico. Fischel et alii<sup>32</sup> desenvolveram um estudo, em 1949, para reavaliar os níveis de complemento em pacientes com moléstia reumática, determinando o CH<sub>50</sub> (complemento hemolítico total). Concluíram, ao contrário dos outros autores, que havia uma elevação do complemento sérico.

Mais tarde, foi constatada por Barnet et alii<sup>10</sup> uma queda do complemento hemolítico total no soro de 4 de 18 casos, sendo que em um caso o complemento estava baixo inicialmente, aumentando mais tarde. Estes dados devem ser vistos com reservas, pois a diminuição do complemento total do soro não é prova conclusiva de ativação do complemento, podendo ser explicada por diminuição da síntese dos componentes.

No estudo de Svartman et alii<sup>106</sup>, foi analisado o líquido sinovial de 25 crianças portadoras de moléstia reumática na fase aguda, onde se constatou uma diminuição de Clq, C3 e C4, indicando forte evidência de ativação do complemento pela via

clássica dentro das articulações. Devido à maior queda de Clq e C4 do que C3, sugere-se no estudo um papel da via clássica maior do que o da alternativa, embora ambas as vias possam estar envolvidas.

Reyes et alii<sup>82</sup> também estudaram o sistema do complemento em moléstia reumática, analisando 9 pacientes na fase aguda da doença e fazendo a determinação de CH<sub>50</sub>, aderência imune para Cl, C4, C2 e C3, contra-imunoelectroforese para fragmentos de C3 e fator B e complemento hemolítico sérico da via alternativa. Seus resultados revelaram que os níveis do complemento sérico era normal. Sapru et alii<sup>89</sup>, por sua vez, descreveram valores reduzidos de C3 e CH<sub>50</sub>. Não sabemos ainda se a ativação do complemento que possa estar havendo em pacientes com M.R. aguda ocorre predominantemente ou isoladamente pela via clássica ou pela via alternativa. Outras questões em aberto, ainda, são: 1) se a presença de ICs ocorre nos mesmos pacientes que têm ativação do complemento, reforçando a interpretação de que a via clássica seja ativada nesta doença; 2) se a ativação do complemento e/ou a presença de ICs circulantes estão associadas com manifestações sistêmicas da M.R., em especial a cardite, febre, pneumonite, proteinúria e provas de função hepática alteradas; 3) se há correlação dos níveis de componentes do complemento ou produtos de ativação destes com provas laboratoriais, tais como proteína C-reativa e velocidade de hemossedimentação e 4) se a ativação do complemento acompanha a resposta clínica ao tratamento.



#### IV - OBJETIVOS

- 1 - Verificar se há envolvimento da(s) via(s) de ativação do complemento em pacientes com moléstia reumática aguda. Este é o objetivo principal do trabalho.
- 2 - Averiguar se há correlação entre os níveis de produtos circulantes de ativação do complemento com as características clínicas e laboratoriais de atividade da doença.
- 3 - Observar se o grau de ativação do complemento acompanha a resposta clínica ao tratamento.
- 4 - Esclarecer se a ativação do complemento ocorre nos mesmos pacientes que apresentam imunecomplexos circulantes e se há correlação estatística entre os dois dados.

## V - PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

## 1 - PACIENTES

Foram estudados 24 pacientes portadores de moléstia reumática, na fase aguda, e acompanhados por 6 meses. Neste grupo, foram incluídos 3 pacientes com coréia de Sydenham (Anexo 2).

Os casos suspeitos foram estudados de acordo com um protocolo pré-estabelecido (Anexo 1) que incluía, entre outros dados: história clínica, exame físico, provas laboratoriais de atividade inflamatória, eletrocardiograma (ECG), radiografia de tórax (Rx) e, se necessário, ecocardiograma.

Para o diagnóstico de moléstia reumática, foram seguidos os critérios de Jones, modificados em 1955<sup>120</sup> e revistos em 1965<sup>105</sup>. Aceitou-se, como evidência de infecção estreptocócica anterior, cultura de orofaringe positiva, ou título de ASO  $\geq$  500 u. Todd, ou um aumento do título de ASO entre o 1º e 10º dia, ou, ainda, o teste de "Streptozyme" positivo<sup>12, 21, 26</sup>.

Vinte pacientes foram internados nas enfermarias do Hospital de Clínicas de Curitiba e 4 outros foram estudados e acompanhados a princípio em outros hospitais, todos atendidos posteriormente no ambulatório desse Hospital.

A faixa etária dos pacientes variou de 6 a 33 anos, com média de 17 anos. Havia 15 mulheres (62%) e 9 homens. Vinte e dois pacientes eram brancos e 2 eram pardos (Anexo 2). Utilizou-se para controle um grupo de 32 indivíduos normais, com faixa etária aproximada à dos pacientes com moléstia reumática. Esses controles foram submetidos a uma história clínica e exame físico. As amostras de soro e plasma dos controles foram colhidas na mesma época que as dos pacientes.

A coleta de sangue dos pacientes com moléstia reumática

foi feita em várias etapas após o diagnóstico da doença. Em todas as etapas, foram realizados a história clínica, o exame físico e exames laboratoriais.

As amostras foram colhidas no dia em que se suspeitou do diagnóstico de M.R., junto com vários exames de rotina (vide protocolo no Anexo 1). Novas amostras foram colhidas no 5º e 10º dias, bem como no final do 1º mês, 3º mês e 6º mês. Em cada ocasião, eram realizados a anamnese, o exame físico e alguns exames laboratoriais.

Todos os exames foram realizados no Laboratório Central do Hospital de Clínicas, utilizando-se recursos já existentes, exceto o teste do "Streptozyme" <sup>12, 21, 26</sup>, não-rotineiramente feito nesse laboratório.

#### EXAMES LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA

##### 1) Hemograma completo

Sangue colhido em tubo do tipo Vacutainer (Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas S.A., Juiz de Fora, MG) contendo EDTA dissódico. O exame foi realizado no Coulter Counter Modelo S.Sr. (Coulter Electronics, INC. Hialeah, Flórida, EUA). A contagem dos leucócitos foi efetuada em extensões coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa.

##### 2) Velocidade de hemossedimentação (VHS)

O mesmo sangue do tubo de Vacutainer foi utilizado para a medida da VHS, segundo o método de Westergren <sup>108, 114</sup>. Valores de até 15 mm para o homem na primeira hora e 20 mm para mulheres foram considerados normais.

### 3) Mucoproteínas séricas

Dosagem realizada em mg% de tirosina, segundo Winzler et alii<sup>108, 122</sup>, modificado. Valores normais, até 4,0 mg% de tirosina.

### 4) Proteína C-reativa (PCR)

Foi utilizado o teste de látex em lâmina, de acordo com especificações originais (Boehringer Mannheim Bioquímica S.A., Rio de Janeiro). Reação positiva (aglutinação) foi registrada em cruces de + a +++, segundo sua intensidade.

### 5) Provas sorológicas para evidência de estreptococ- cia anterior

A prova de inibição da hemólise pela estreptolisina O foi realizada segundo as especificações originais (Sclavo Divisione Diagnostici Siena, Itália). Valores iguais ou maiores que 500 unidades Todd foram considerados evidências de estreptococcia anterior<sup>18, 24-25-26</sup>. Se o valor obtido no soro do 1º dia fosse inferior a 500 unidades Todd, amostras pareadas do 1º dia e 10º dia eram realizadas com o soro estocado, procurando aumento do título, como evidência de infecção recente. Se não houvesse aumento significativo nesta prova, era utilizado o teste do "Streptozyme"<sup>12, 21, 25-26-27</sup> (Wampole Laboratories, New Jersey, EUA), de acordo com as especificações de origem. Os resultados (+) ou (-) foram dados pela presença ou ausência de aglutinação, respectivamente.

#### 6) Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBs)

Todas as amostras do 1º dia foram testadas para a presença de HBs pelo Banco de Sangue do Hospital de Clínicas, Curitiba, pelo método Imunoenzimático (Auszyme II - Abbott Laboratories, Chicago, EUA), de acordo com as especificações originais.

#### 7) Urinálise com dosagem semiquantitativa de proteínas

Realizado com a fita reativa (Combur-9 test Boehringer Mannheim Bioquímica S.A., Rio de Janeiro), de acordo com as instruções de origem. Se a área de proteínas ficasse alterada, separavam-se 2 ml de urina, pingavam-se 6 gotas de ácido sulfasalicílico a 10%. Comparava-se com a urina sem o reativo. Turvação: traços, +, ++, +++, +++++. Para a dosagem quantitativa de proteínas, seguia-se o método de Kingsbury-Clark<sup>33</sup>.

#### 8) Dosagem de transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubinas

Os métodos rotineiros do serviço de bioquímica do Laboratório Central do Hospital de Clínicas foram seguidos:

##### Transaminases (Reitman-Frankel)<sup>33</sup>

SGOT : 8 a 40 unidades (Valores normais)

SGPT : 8 a 40 unidades (Valores normais)

##### Bilirrubinas (Malloy Evelyn)<sup>33</sup>

Direta : 0,1 - 0,6 mg% (Valores normais)

Total : 0,3 - 0,6 mg% (Valores normais)

Fosfatase alcalina (Bodansky) <sup>33</sup>

Adultos : 1,0 a 5,0 unidades (Valores normais)

Crianças : 5,0 a 10,0 unidades (Valores normais)

9) Radiografia de Tórax

Realizada nas incidências pôsterio-anterior (PA) e perfil esquerdo (PE), sempre que possível com esôfago contrastado.

10) Eletrocardiograma

Todas as provas laboratoriais acima foram realizadas no 1º dia. Nos demais dias, foram efetuados hemograma com VHS, ASO, mucoproteínas, PCR e urinálise. ECG e Rx de tórax eram repetidos se houvesse suspeita do envolvimento cardíaco na doença, ou se houvesse alterações anteriores nesses exames.

Quando havia indicação clínica, eram realizados, segundo técnicas rotineiras em nosso Hospital:

- 1) Provas de falcização das hemácias;
- 2) Pesquisa de fator reumatóide pelas provas de látex e Waaler-Rose;
- 3) Pesquisa de fatores antinucleares;
- 4) Pesquisa de gonococos: cultura e esfregaços corados pelo Gram;
- 5) Teste de aglutinação para Brucelose;
- 6) Ecocardiograma (Módulo-M), principalmente para detecção de endocardite;
- 7) Hemoculturas, em suspeita de endocardite bacteriana ou por fungos.

A terapêutica instituída para os pacientes com moléstia



reumática aguda, com ou sem artrite, cardite ou outras manifestações, foi orientada pelas disciplinas envolvidas no caso. A maioria dos pacientes não estava fazendo uso de penicilina ou corticosteróides, quando da primeira avaliação. Todos receberam penicilina, alguns receberam corticosteróides e a maioria recebeu ácido acetilsalicílico durante as 4 primeiras semanas.

## 2 - MATERIAL

AGAROSE (Sea Kem-tipo M.E.) (Marine Colloids, Inc., Rockland, Maryland, EUA), diluída em tampão barbital-tris-glicina (vide adiante) a 1% peso/volume.

INULINA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA).

POLIETILENOGLICOL 6.000 (PEG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) 55% - aquecer 500 ml de tampão de borato até aproximadamente 60°C, enquanto se adicionam lentamente 550 g de polietilenoglicol (PEG), durante uso constante de misturador magnético. Completar para 1.000 ml, quando resfriar para a temperatura ambiente.

SOLUÇÃO CORANTE - fórmula recomendada por Weeke, em 1973<sup>7</sup>: azul-brilhante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 50 g; etanol 96% - 4.500 ml; ácido acético glacial - 1.000 ml; água destilada - 4.500 ml. O corante é dissolvido em etanol acético e deixado à temperatura ambiente até o dia seguinte e, a seguir, filtrado.

SOLUÇÃO DESCORANTE - mesma fórmula que a solução corante, exceto pela adição de azul-brilhante. Ambas as soluções,

corante e descorante, devem ser mantidas hermeticamente fechadas, para evitar evaporação.

SOLUÇÃO-ESTOQUE de EDTA 0,2 M ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - sal dissódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 67,2 g; ácido etilenoaminotetracético (EDTA) - sal tetrassódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 76,0 g; água destilada para completar 2 litros.

TAMPÃO DE BARBITAL-TRIS-GLICINA (BTG) - fórmula recomendada por Weeke<sup>7</sup>, em 1973. A solução-estoque é obtida misturando-se os tampões A, B, C: tampão A: barbital sódico (E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha) - 65 g; ácido barbitúrico (E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha) - 10,35 g; completar com água destilada para 3 litros. Tampão B: glicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 281 g; tris (Trizma Base, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 226 g; completar com água destilada para 3 litros. Tampão C: ácido diaminoetilenotetracético (EDTA) - sal dissódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 58,8 g; ácido diaminoetilenotetracético - sal tetrassódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) - 66,5 g; completar com água destilada para 4 litros. A solução-estoque é guardada em câmara fria a 4 °C com timerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) a 1:10.000. A solução para uso é preparada diluindo-se a solução-estoque 1:3 em água destilada. Obtém-se então um tampão com pH=8,6.

TAMPÃO DE BORATO: Reagente A: borato de sódio (Mallinckrodt, Inc., Paris, Kentucky, EUA) - 19,08 g; solução-estoque de EDTA 0,2 M - 25 ml; completar para 600 ml com água destilada. Reagente B: ácido bórico (Mallinckrodt Inc., Paris, Kentucky,

EUA) - 12,37 g; solução-estoque de EDTA 0,2 M - 100 Ml; completar para 2 litros com água destilada. Adicionar uma parte de reagente A e aproximadamente 6 partes de reagente B, até que o pH 8,3 seja alcançado (22 °C).

Material para a avaliação dos níveis séricos do complemento hemolítico total ( $CH_{50}$ ), segundo técnica de Mayer<sup>62</sup>.

Placas de imunodifusão radial, para a dosagem dos componentes C3 e C4 (Nor-Partigen, Behring Institut, Alemanha), de acordo com as especificações de origem.

Cuba para eletroforese com capacidade para 2 litros de tampão.

Fonte estabilizadora (0 a 500 V e 0 a 100 mA).

Papel-filtro Whatman nº 1 (Made in England by W & R. BALSION LTD.), espessura de 0,16 mm.

## 2.1 - Preparo de Reagentes Imunoquímicos e Outros Materiais Biológicos

Soro antifator B foi preparado de cabras que haviam sido imunizadas com o fator B do plasma humano isolado. Este antifator B resultante reconhece fator B e fragmentos Ba e Bb. Este soro havia sido testado e armazenado a -70 °C, até seu uso. Foi doação do Dr. John G. Curd, da Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, Califórnia, EUA.

Isolamento do fragmento Ba foi realizado pelo método descrito por Lesavre & Müller-Eberhard, 1978<sup>57</sup> e as concentrações foram determinadas pelo método de Lowry, 1951. Foi preparado pelo Dr. André Balla na Scripps Clinic and Research Foundation,

La Jolla, Califórnia, EUA.

Soro anti-C4 foi preparado em coelhos que haviam sido imunizados com C4. Este soro anti-C4 reconhece C4 e seu fragmento C4d, sendo cedido gentilmente pelo Dr. John G. Curd, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, Califórnia, EUA.

Ativação do fator B no soro: soro humano normal ativado por inulina (SHN-I) foi preparado pela incubação de 5 ml de soro com 1 ml de uma suspensão de inulina a 10 mg/ml por 60 minutos a 37°C. A inulina foi removida por centrifugação a 900 X G por 5 minutos e o soro ativado foi guardado a -70 °C, até o seu uso. Quando SHN-I foi misturado a volumes variáveis de plasma humano normal (PHN), obtiveram-se concentrações de 1 a 12% (Ex.: SHN-I 2%, SHN-I 4%).

Soro e plasma humanos normais e patológicos: amostras de sangue foram obtidas por veno-punção com seringas de plástico, sem formação de bolhas e imediatamente colocadas em tubos de vidro, imersos em gelo. Para a separação do plasma, 9 ml de sangue foram colocados nos tubos de vidro contendo 1 ml de EDTA dissódico 0,2 M, pH=7,2. Sangue destinado à separação do soro foi colocado em tubos sem anticoagulante, volume de 10 ml, incubados em banho-maria a 37°C, por 20 minutos, quando então as amostras de sangue com e sem anticoagulante foram centrifugadas a 1.200 X G, por 20 minutos, em centrífuga com refrigeração constante a 4°C (Sorvall RC-3, Newtown, Connecticut, EUA), separadas e aliquotadas a -70 °C para uso posterior.

### 3 - MÉTODOS

Foram utilizados testes de determinação do complemento e seus fragmentos, dosagem de  $CH_{50}$ , C3 e C4, e testes de detecção de imunecomplexos circulantes.

A) Determinação de C4 e C4d por imunoeletrodifusão quantitativa de Laurell, também denominada imunoeletroforese "em foguete", foi realizada com uma modificação do método de Laurell, 1966<sup>56</sup>, conforme Milgrom<sup>64</sup>, com pequenas variações.

Um volume de 9,5 ml de agarose a 1% em tampão BTG foi derretido em banho-maria a 100°C e resfriado até 56°C, quando então foi misturado com o anti-soro anti-C4, 450 µl, despejando o volume em placas de vidro aquecidas, medindo 17,5 cm e 4,0 cm. Deixou-se esfriar para formar gel, quando então se perfurou, formando orifícios circulares de 3 mm de diâmetro, distantes um dos outros 7 mm do seu ponto central. Amostras de 5 µl de plasma descongelado, a 4°C, foram colocadas em cada orifício, enquanto a placa era submetida a 3V/cm de corrente contínua a 4°C por 16 horas, sob umidade permanente. O tampão utilizado na eletroforese foi BTG. Após a eletroforese, as placas foram comprimidas com papel-filtro seco, com posterior secagem e coloração por azul-brilhante de Coomassie. Posteriormente, foi medida, com auxílio de uma régua milimetrada, a altura dos arcos de precipitação de C4 e C4d pela projeção da lâmina em um microprojektor, aumentando-se a imagem 8 X. A presença de apenas um arco significa que o plasma só tem C4 nativo (plasma sem quantidade detectável de produtos de ativação de C4). A presença de 2 arcos significa que há C4d no plasma, formando o 2º arco. A proporção entre C4d e C4 reflete o grau de ativação do complemento pela

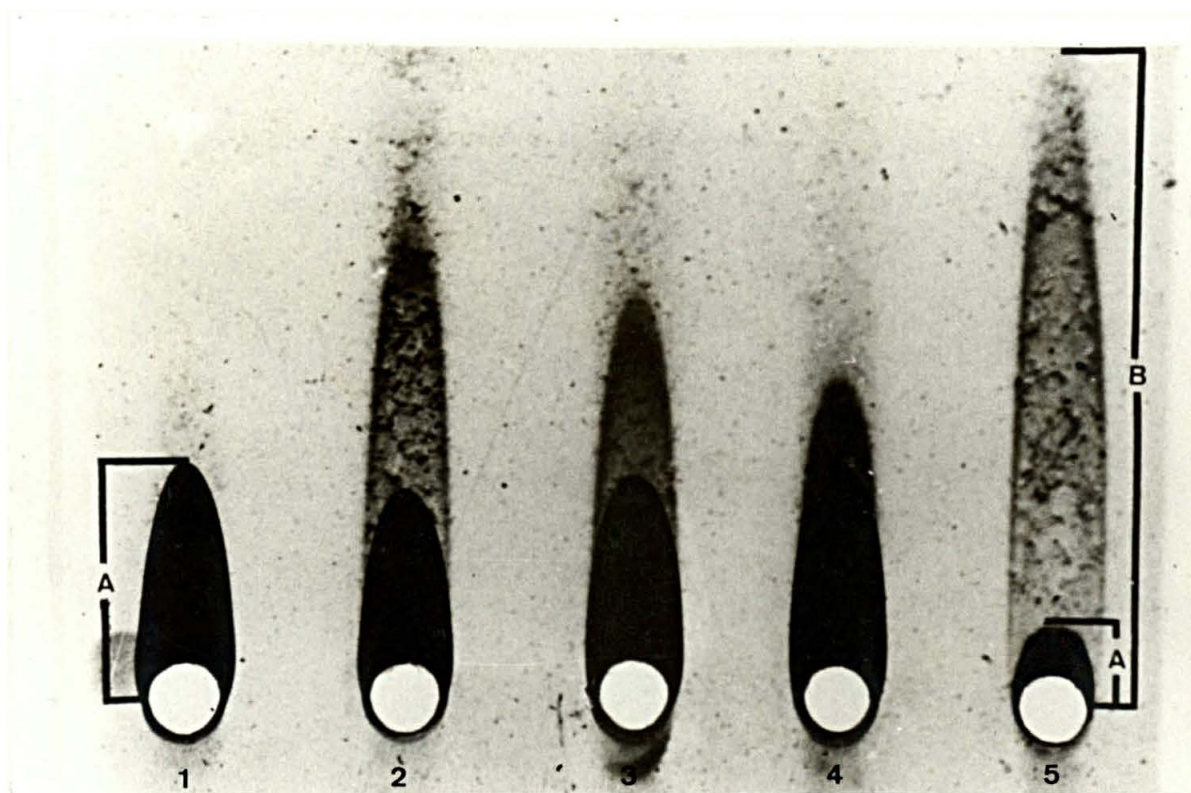


FIGURA 2 - Imunoeletroforese "em foguete" para a determinação de C4 e C4d.

Nº 1: plasma humano normal, apresentando apenas arco de C4 (A); Nºs 2, 3 e 4: plasma de paciente com M.R. no 1º dia, 3º e 6º mês, respectivamente, observando-se aumento gradual dos arcos de C4 e diminuição dos arcos de C4d; Nº 5: plasma de paciente portador de angioedema hereditário, mostrando pequeno arco de C4 (A) e grande quantidade de C4d (B).

via clássica. Quando nenhum arco de C4d foi observado, considerou-se a relação C4d/C4 igual a 1,0. Exemplo pode ser visto na Figura 2. Em estudo preliminar, notamos excelente correlação entre áreas e alturas dos arcos de C4d e C4. Por isso, optamos por medir apenas a altura para obter o índice C4d/C4.

B) Dosagem do fragmento Ba foi realizada por uma modificação da técnica de Laurell de imunoeletroforese "em foguete" em agarose. Na técnica desenvolvida por Balla et alii<sup>8</sup>, para medir o fragmento Ba, há necessidade de tratamento prévio do plasma para que se possa medir este fragmento, utilizando-se a precipitação do fator B e do fragmento Bb com polietilenoglicol (PEG) 6.000 a 40% (peso/volume). Por imunoeletroforese padrão, realizada de acordo com o método usual, demonstrou-se a efetividade da precipitação destes fatores com PEG (Fig. 3)<sup>8</sup>. Sobre a amostra de plasma (200 µl), durante agitação contínua por misturador do tipo Vortex, acrescentaram-se 200 µl de PEG. Incubou-se a 4 °C por 3 horas e, a seguir, centrifugou-se a 1.200 X G por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi colocado imediatamente em placa de eletroforese. O precipitado continha o fator B e o fragmento Bb, e o sobrenadante, o fragmento Ba. Na preparação da placa, utilizou-se de 9,5 ml de agarose a 1% em tampão BTG, que foi derretido em banho-maria a 100°C e resfriado até 56°C quando então foi misturado com o anti-soro anti-B, 120 µl. Despejou-se o volume em placas aquecidas, com as mesmas dimensões para a determinação de C4. Deixou-se esfriar para formar gel, quando então se perfurou, formando orifícios circulares de 5 mm de diâmetro, distante um dos outros aproximadamente 9 mm, centro a centro. Amostras de 50 µl, de plasma descongelado, a 4°C,



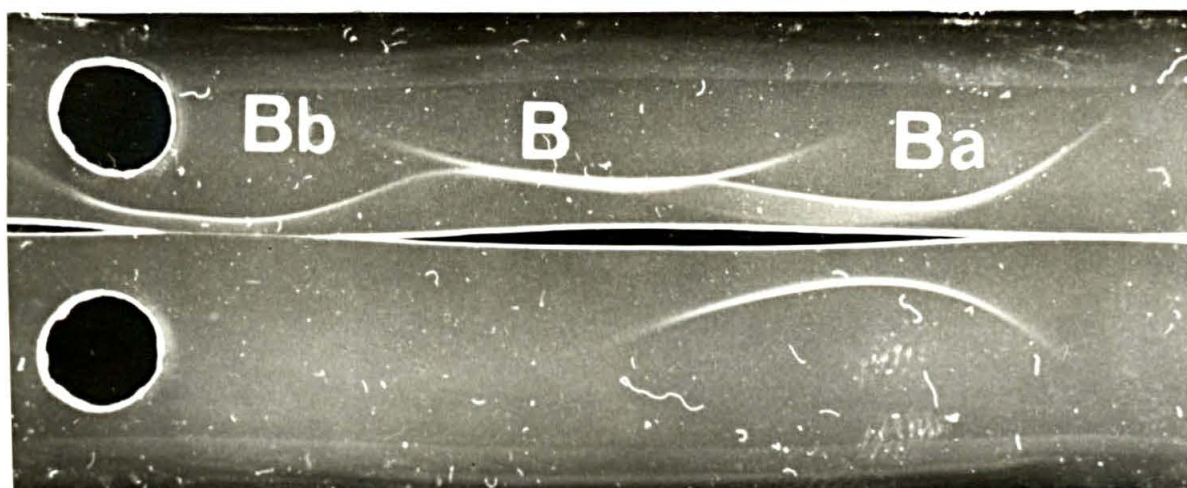


FIGURA 3 - Imunoeletroforese padrão utilizando anti-soro antifator B.

Na cavidade superior foi colocado soro humano normal ativado por inulina. O mesmo soro foi colocado na cavidade inferior, após o tratamento com polietilenoglicol. A única linha de precipitação residual tem a mobilidade eletroforética de Ba. Figura reproduzida<sup>8</sup>.

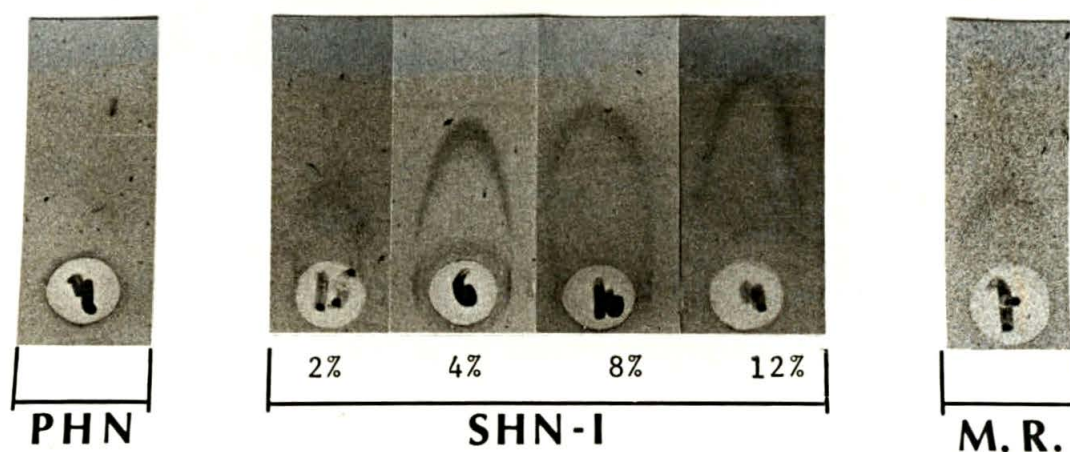


FIGURA 4 - Demonstração de Ba por imunoeletroforese "em foguete", em seis amostras de plasma.

PHN: Plasma humano normal - controle.

SHN-I: Soro humano normal ativado por inulina adicionada a PHN, para obter várias concentrações finais.

M.R.: Plasma de paciente com moléstia reumática com Ba detectável.



foram colocados em cada orifício, enquanto a placa foi submetida a 2,5 V/cm de corrente contínua a 4°C por 12 horas em solução de BTG, sob umidade permanente. Após a eletroforese, as placas foram comprimidas em papel-filtro seco e sob peso, com posterior secagem e coloração por azul-brilhante de Coomassie. O método de mensuração foi semelhante ao da lâmina de C4. As concentrações do fragmento Ba em amostras de plasma foram determinadas por comparação com as produzidas por adição de quantidades conhecidas de Ba purificado a plasma humano normal (Fig. 4). Estas concentrações finais, com quantidades conhecidas do fragmento Ba, foram correlacionadas com as medidas das alturas dos arcos do fragmento Ba. Cada placa de imunoeletroforese de C4 continha 22 orifícios (cavidades), e as placas para medir a concentração do fragmento Ba, 19 orifícios. Cada placa de imunoeletroforese para Ba continha até cinco orifícios, reservados para a obtenção de curva padrão com quantidades conhecidas de Ba.

C) Dosagem de  $CH_{50}$ , C3 e C4: a avaliação dos níveis séricos do complemento hemolítico total ( $CH_{50}$ ) foi realizada segundo a técnica de Mayer<sup>62</sup>. A dosagem dos componentes C3 e C4 foi feita por imunodifusão radial, conforme recomendações de origem (Nor-Partigen, Behring Institut, Alemanha). Estes testes foram realizados em amostras de soro colhidas no 1º dia e 6º mês de acompanhamento dos pacientes.

D) Dois métodos foram utilizados para a quantificação de imunocomplexos circulantes: os radioimunoensaios da congutina (K)<sup>111</sup> e do fator reumatóide monoclonal (FRm)<sup>11</sup>. Estes testes foram realizados no Laboratório de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina, pela biomédica Sônia K. Nishida, sob supervisão

do Dr. Aparecido B. Pereira.

D.1) O ensaio da congulinina constitui-se de um ensaio imunorradiométrico, em que uma diluição ideal de congulinina bovina é ligada a uma placa de microtitulação flexível. O soro é adicionado, diluído a 1/20 em tampão contendo cálcio (BBS-Tween 0,05% - 0,2 mM $\text{Ca}^{++}$ ), incubado durante 16 horas a 4 °C. Os imunocomplexos circulantes de IgG ligados são quantificados por reação com  $^{125}\text{I}$ -anti-IgG humana. Considerando que este tipo de ensaio não deve ser e, na verdade, não é "quantitativo", deixamos de expressar o resultado em  $\mu\text{g}$  de GGA/ml (Gamaglobulina agregada) de soro, como vinha sendo feita na literatura. Expressou-se o resultado em % de  $^{125}\text{I}$ -anti-IgG ligada à placa, considerando como 100% um soro ao qual se adicionaram 2.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de GGA e incubou-se a 37 °C, por 30 minutos, para ativação do complemento com formação de GGA-C3. O valor normal do Laboratório de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina é de até 7,4%.

D.2) O FRm foi isolado do soro de uma paciente com doença linfoproliferativa, apresentando crioglobulinemia e altos títulos de fator reumatóide. A purificação do FRm foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de IgG humana-Sepharose e diluição em tampão glicina-HCl, pH=2,8 e cromatografia, ainda em condições dissociantes, em Sephacryl S-300. Trata-se de uma IgM-Kappa, sem contaminação com IgG. Marcado com  $^{125}\text{I}$  pela técnica da Cloramina T<sup>73</sup>, este FRm é adicionado ao soro do paciente diluído 1/5 em PBS-Tween (25  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -FRm por tubo + 100  $\mu\text{l}$  de soro + 400  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween): incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente e depois se adicionou PEG, para uma concentração final de 3,5%. Após 1 hora, centrifugou-se a 2.000 rpm por 20 minutos e contou-se o precipitado, em contador gama. O

valor 100% corresponde ao soro ao qual se adicionou um excesso de GGA, 2.000  $\mu\text{g/ml}$  de soro. O material detectável no ensaio foi precipitado por PEG. O intervalo de referência usado foi de até 5,2% de precipitação.

#### E) Método estatístico

Considerando a natureza das distribuições dos valores das variáveis estudadas, preferimos trabalhar com testes não-paramétricos<sup>97</sup>. Assim, utilizamos os seguintes:

1) Teste de Mann-Whitney, com aproximação à curva normal (estatística Z), para amostras independentes, quando comparamos o grupo-controle e o grupo de pacientes com moléstia reumática, com relação aos valores de C4d/C4 e Ba.

2) Análise de variância por postos de Friedman (estatística  $\chi^2$ ) para comparar, em cada paciente, os valores de C4d/C4 e Ba observados nos vários tempos estudados. Quando a análise mostrou diferença significativa, ela foi completada pelo teste de comparações múltiplas<sup>43</sup>.

3) Coeficiente de correlação de postos de Spearman (estatística  $r_s$ ), para estudar a possível correlação entre os valores de C4d/C4 e os do fragmento Ba.

4) Teste Q de Cochran (estatística Q), para estudar a concordância entre as manifestações clínico-laboratoriais com os níveis de ativação do complemento.

5) Teste de McNemar, para estudar as possíveis discordâncias entre os métodos clínico-laboratoriais e os valores de C4d/C4 e os do fragmento Ba.

Em todos os testes estatísticos, fixamos em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade. Quando a estatística calculada apresentou um valor significativo, usou-se um asterisco (\*) para caracterizá-la.

## VI - RESULTADOS

## 1.1 - DETERMINAÇÃO DE C4 E RELAÇÃO C4d/C4

### 1.1.1 - Pacientes com Moléstia Reumática

Amostras de sangue de 24 pacientes, colhidas no 1º dia, foram utilizadas para a determinação do componente C4 e relação C4d/C4. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela V e Figura 5.

### 1.1.2 - Grupo-Controle

Utilizaram-se 32 plasmas-controles para a determinação de C4 e relação C4d/C4. Desses, 14 apresentavam somente o componente C4 e nos demais havia concomitantemente o fragmento C4d (Tabela V). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para a comparação do grupo de pacientes com o grupo-controle. A média do grupo de pacientes (média = 1,73) foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ) do que a média do grupo-controle (média = 1,18).

### 1.1.3 - Determinação da Relação C4d/C4 das Amostras de Plasma nos Vários Períodos Estudados

Para o grupo de pacientes, realizamos 3 determinações da relação C4d/C4: no 1º dia, 3º mês e 6º mês. Estes resultados são apresentados na Tabela VI e Figuras 6 e 7. Não temos os valores dos pacientes nºs 8, 9 e 13, porque não dispúnhamos de amostra de plasma para a determinação da relação C4d/C4 no 3º mês.

TABELA V - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4, OBSERVADOS NO GRUPO-CONTROLE E NO GRUPO DE PACIENTES COM M.R. NO 1º DIA.

GRUPOS	
CONTROLES	PACIENTES
1,00	2,10
1,00	2,65
1,00	1,57
1,00	1,73
1,00	1,29
1,00	2,75
1,00	1,86
1,00	3,00
1,00	1,36
1,00	1,52
1,00	1,89
1,00	2,18
1,00	2,29
1,00	1,35
1,29	1,53
1,12	1,09
1,40	1,85
1,43	1,06
1,29	1,77
1,15	1,40
1,50	1,35
1,46	1,40
1,40	1,42
1,28	1,13
1,30	
1,20	
1,67	
1,28	
1,21	
1,18	
1,36	
1,17	
Média	1,18
	1,73

Teste de Mann-Whitney com aproximação à distribuição normal

Z calculado = 4,76\*

Z crítico = 1,96

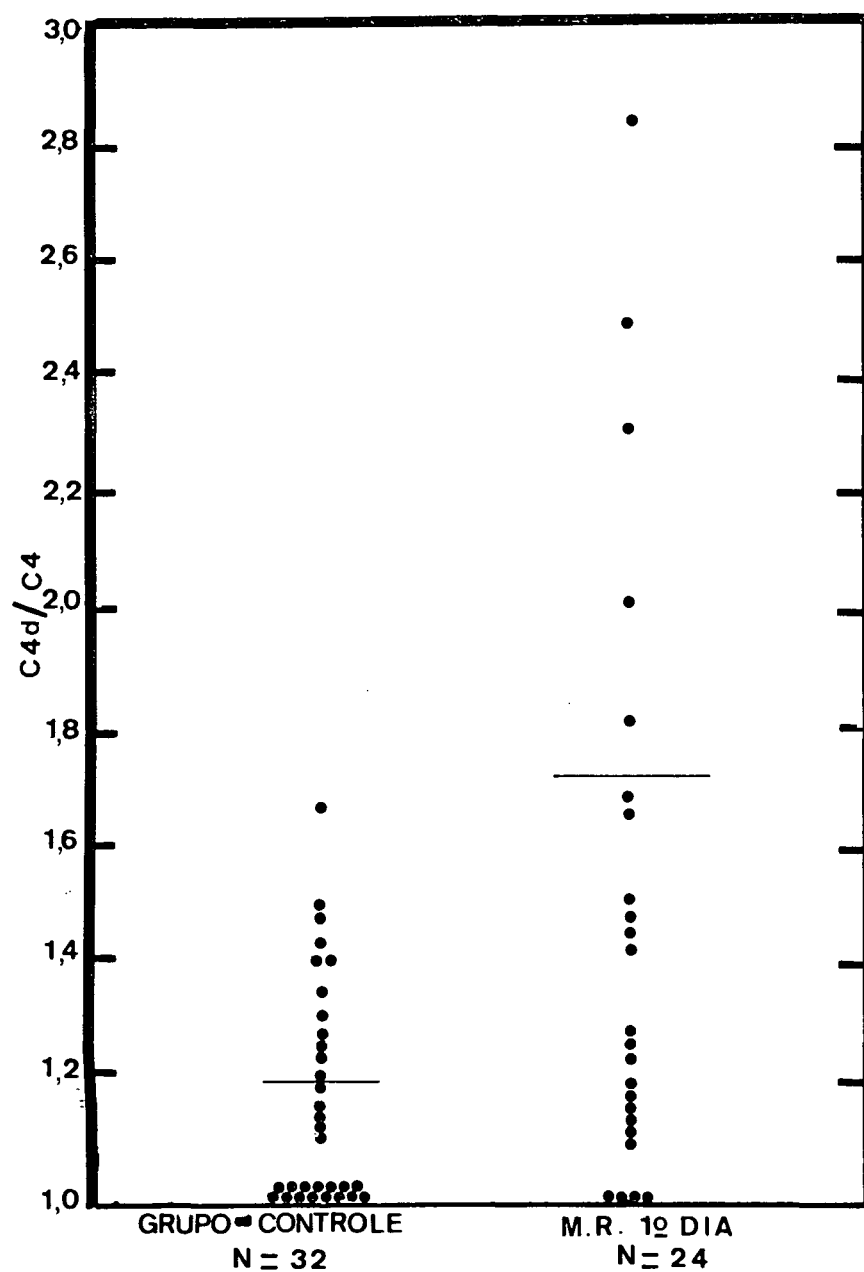


FIGURA 5 - Valores da relação  $C4d/C4$  no plasma de indivíduos normais e pacientes com M.R., medidos por imunoelektroforese "em foguete" ( $p < 0,001$ ).

N = número de pacientes.

Obs.: A linha contínua representa a média dos valores.



TABELA VI - VALORES DA RELAÇÃO C4d/C4 EM PACIENTES COM M.R., NOS 3 PERÍODOS ESTUDADOS.

PACIENTES		PERÍODOS		
Nº	1º DIA	3º MÊS	6º MÊS	
1	2,10	1,61	1,18	
2	2,65	1,95	1,43	
3	1,57	1,35	1,28	
4	1,73	1,39	1,13	
5	1,29	1,00	1,80	
6	2,75	1,14	1,00	
7	1,86	1,51	1,41	
10	1,52	1,11	1,46	
11	1,89	1,23	1,28	
12	2,18	1,00	2,02	
14	1,35	1,30	1,50	
15	1,53	1,15	1,00	
16	1,09	1,00	1,00	
17	1,85	1,00	1,00	
18	1,06	1,00	2,50	
19	1,77	1,37	2,34	
20	1,40	1,23	1,20	
21	1,35	1,20	1,15	
22	1,40	1,62	1,27	
23	1,42	1,63	1,66	
24	1,13	2,58	2,84	
Média	1,66	1,35	1,50	
Soma dos postos (R)	54	35	37	

Análise de variância por postos de Friedman

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 10,38^* \quad \chi^2_{\text{crítico}} = \chi^2 (2 \text{ gl}; 0,05) = 5,99$$

Teste de comparações múltiplas. Diferença mínima significativa = 15,20 (0,05)

$$|R_{1^\circ \text{ dia}} - R_{3^\circ \text{ mês}}| = 19,0^*$$

$$|R_{1^\circ \text{ dia}} - R_{6^\circ \text{ mês}}| = 17,0^*$$

$$|R_{3^\circ \text{ mês}} - R_{6^\circ \text{ mês}}| = 2,0$$

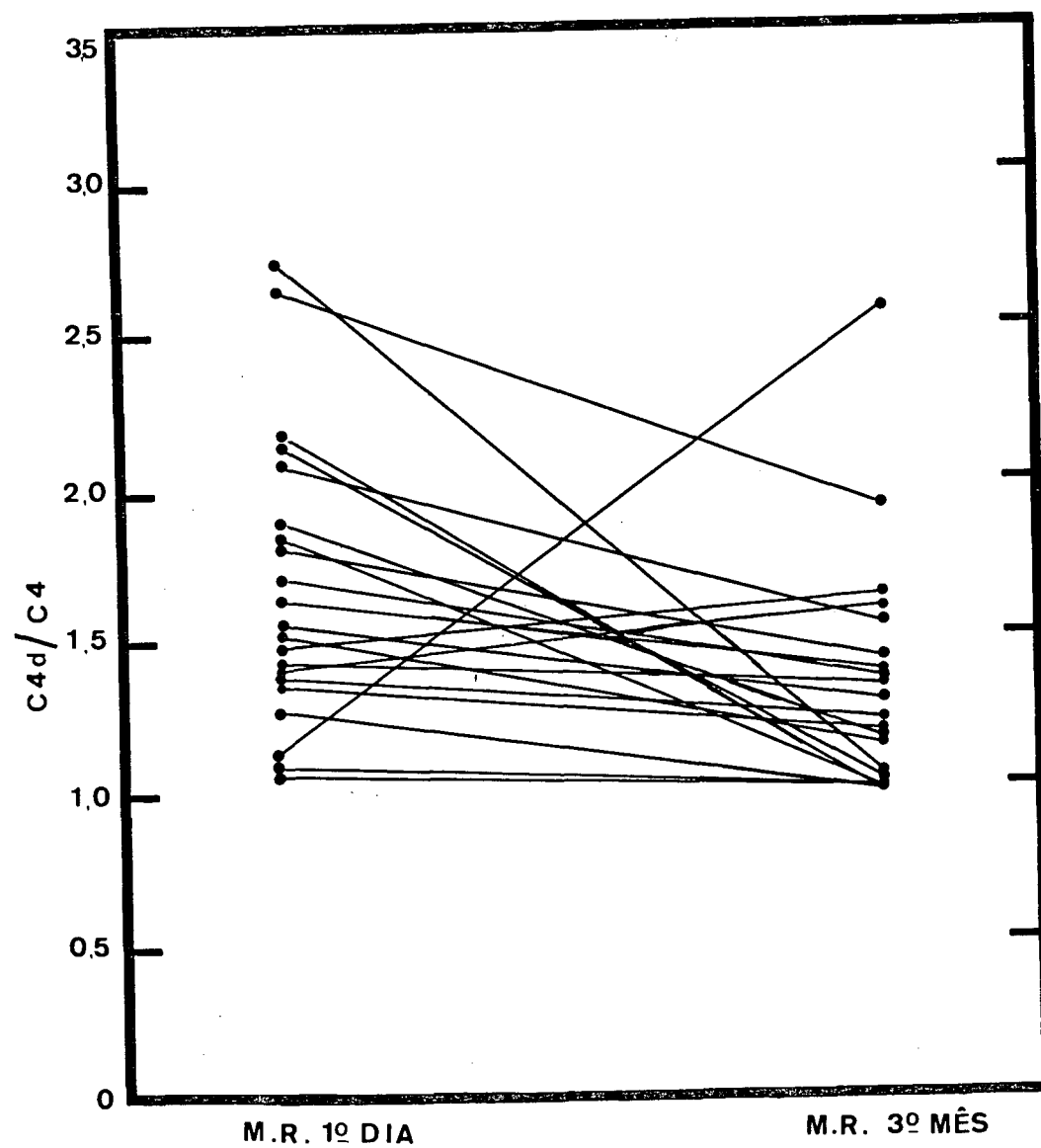


FIGURA 6 - Valores da relação  $C4d/C4$  de pacientes com M.R. em amostras de plasma do 10 dia e 30 mês ( $p < 0,01$ ).

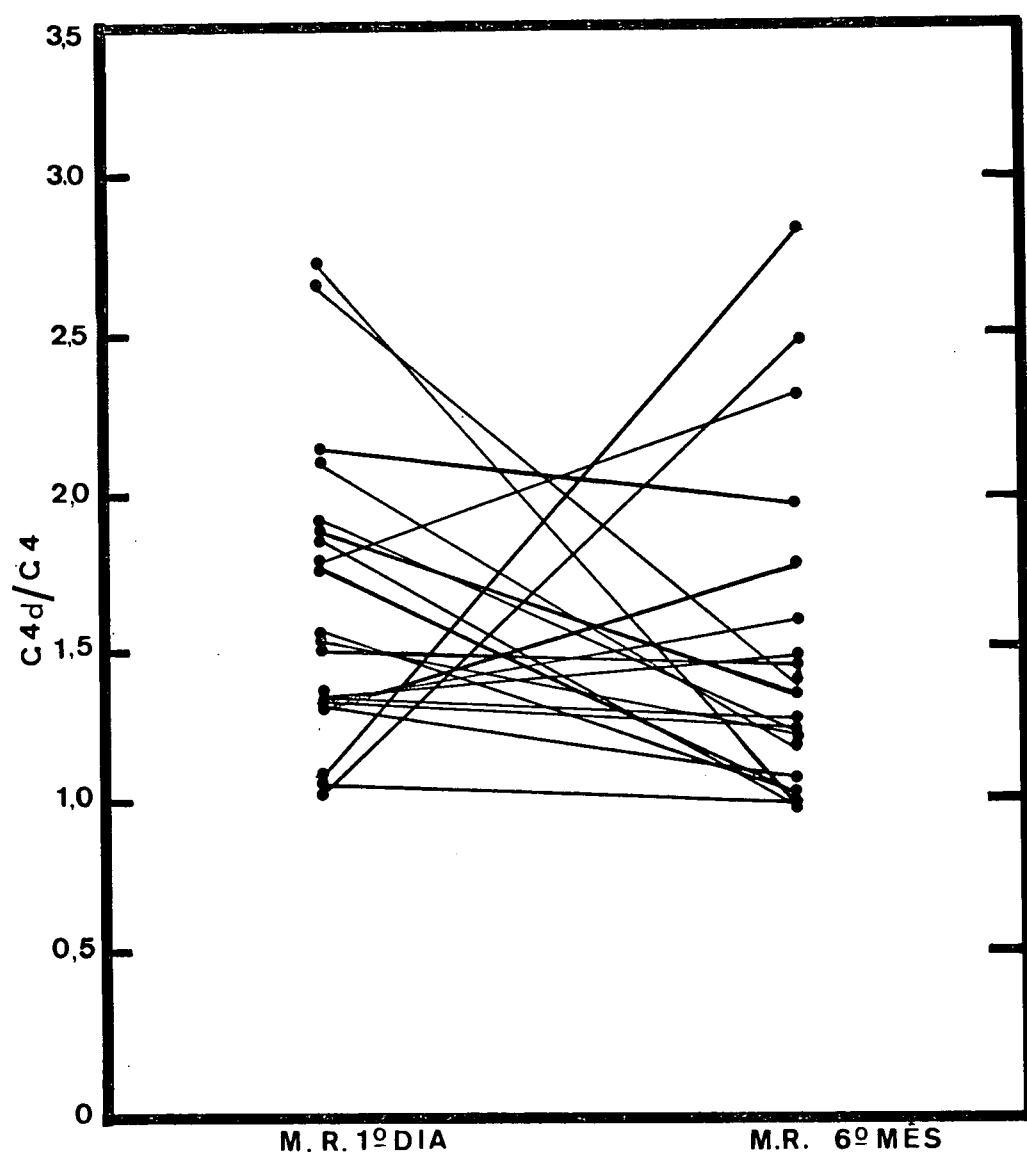


FIGURA 7 - Valores da relação  $C4d/C4$  de pacientes com M.R. em amostras de plasma do 1º dia e 6º mês ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados foram submetidos à análise de variância por postos de Friedman, a qual mostrou que a média do 1º dia (média = 1,66) foi significativamente maior que as médias do 3º mês (média = 1,35) e 6º mês (média = 1,50).

## 1.2 - DOSAGEM DO FRAGMENTO Ba

### 1.2.1 - Pacientes com Moléstia Reumática

Dos 24 pacientes, 10 apresentavam níveis detectáveis do fragmento Ba. Os resultados são apresentados na Tabela VII e Figura 8.

### 1.2.2 - Grupo-Controle

Trinta e dois plasmas de indivíduos do grupo-controle foram analisados para esta dosagem e sua presença foi detectável em 6 deles (Tabela VII). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação do grupo de pacientes com o grupo-controle. A média do grupo de pacientes (média = 1,43) foi significativamente maior ( $p < 0,02$ ) do que a média do grupo-controle (média = 0,64).

### 1.2.3 - Dosagem do Fragmento Ba Plasmático nos Vários Períodos Estudados

Para o grupo de pacientes com M.R., foi dosado o fragmento Ba nos 3 períodos estudados, 1º dia, 3º mês e 6º mês. Estes resultados são apresentados na Tabela VIII. Não temos os

TABELA VII - RESULTADOS DOS NÍVEIS DA DOSAGEM DO FRAGMENTO Ba,  
DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM M.R. NO 1º DIA.

GRUPOS	
CONTROLES (µg/ml)	PACIENTES (µg/ml)
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	2,50
0	4,30
0	2,90
0	6,45
0	2,60
0	6,20
0	2,45
0	1,70
0	3,10
0	2,10
0	
0	
2,70	
2,05	
1,85	
10,35	
2,10	
1,50	
Média	0,64
	1,43

Teste de Mann-Whitney com aproximação à distribuição normal

Z calculado = 2,10 \*

Z crítico = 1,96

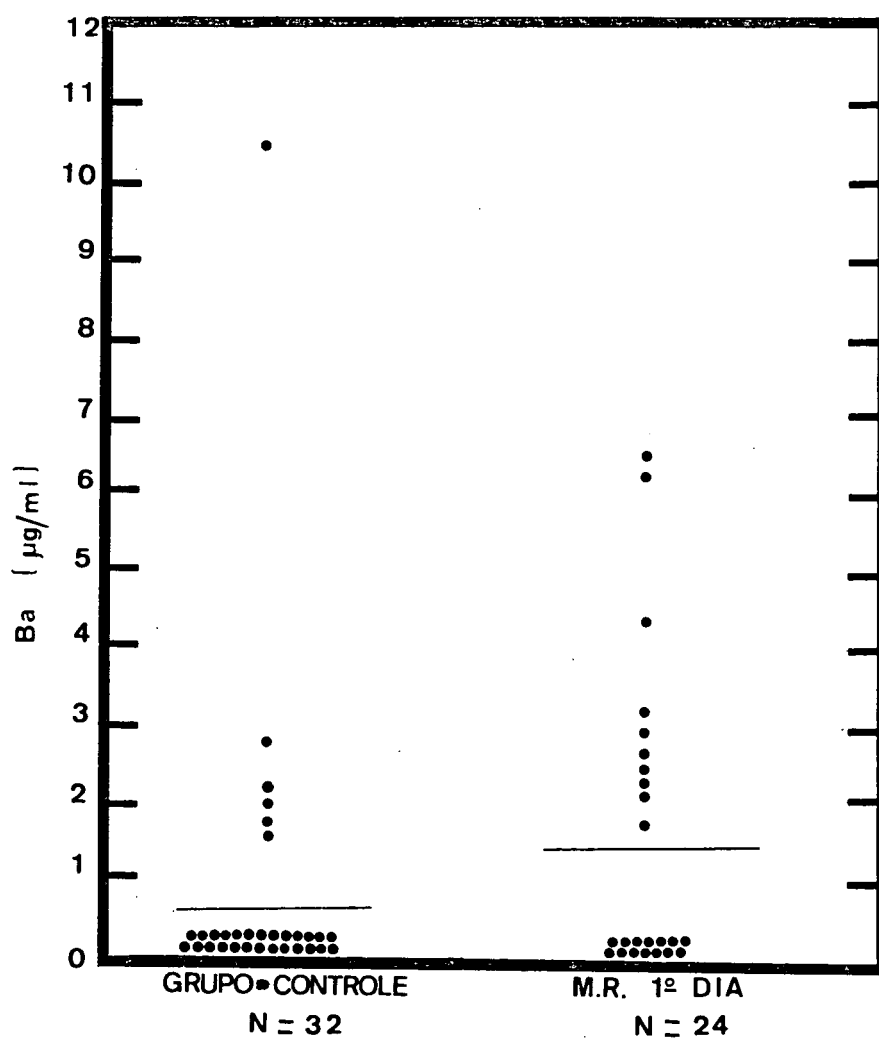


FIGURA 8 - Valores dos níveis plasmáticos do fragmento Ba de indivíduos normais e pacientes com M.R., medidos por imunoeletroforese "em foguete" ( $p < 0,02$ ).

N = número de pacientes.

Obs.: A linha contínua representa a média dos valores.

TABELA VIII - NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba NOS PACIENTES COM M.R. NOS 3 PERÍODOS ESTUDADOS.

PACIENTES Nº	PERÍODOS		
	1º dia (µg/ml)	3º mês (µg/ml)	6º mês (µg/ml)
1	0	0	0
2	2,50	2,00	1,80
3	4,30	0	2,30
4	2,90	0	8,80
5	0	0	0
6	6,45	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
10	2,60	0	0
11	0	0	9,90
12	0	0	2,80
14	2,45	0,90	0
15	0	0	1,50
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1,70	0	0
22	2,10	2,80	0
23	0	2,30	2,0
24	0	0	0
Média	1,19	0,38	1,39
Soma dos postos <sub>(R)</sub>	45,5	39	41,5

Análise de variância por postos de Friedman

$\chi_r^2$  calculado = 2,05

$\chi_r^2$  crítico =  $\chi^2(2 \text{ gl}; 0,05) = 5,99$

valores dos pacientes nºs 9, 13 e 21 porque não dispúnhamos de amostra de plasma para a dosagem de Ba no 3º mês. Os resultados foram submetidos à análise de variância por postos de Friedman, feita para 21 dos 24 pacientes estudados, que não mostrou diferença significativa entre os 3 períodos estudados.

### 1.3 - CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba E A RELAÇÃO C4d/C4, OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO 1º DIA EM PACIENTES COM M.R.

Objetivando o relacionamento dos valores já estudados, submetemos os mesmos ao cálculo de correlação de postos de Spearman ( $r_s$ ). O resultado é apresentado na Tabela IX. O coeficiente de correlação de postos de Spearman foi de 0,26, mostrando não haver boa correlação entre os valores de Ba e de C4d/C4.



TABELA IX - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE POSTOS DE SPEARMAN ENTRE OS NÍVEIS DO FRAGMENTO Ba E A RELAÇÃO C4d/C4.

PACIENTES Nº	VALOR DO FRAGMENTO Ba ( $\mu\text{g/ml}$ )	VALOR DA RELAÇÃO C4d/C4
1	0	2,10
2	2,50	2,65
3	4,30	1,57
4	2,90	1,73
5	0	1,29
6	6,45	2,75
7	0	1,86
8	0	3,00
9	0	1,36
10	2,60	1,52
11	0	1,89
12	0	2,18
13	6,20	2,29
14	2,45	2,35
15	0	1,53
16	0	1,09
17	0	1,85
18	0	1,06
19	0	1,77
20	1,70	1,40
21	3,10	1,35
22	2,10	1,40
23	0	1,42
24	0	1,13

$r_s$  calculado = 0,26

$r_s$  crítico =  $r_s$  (22 gl; 0,05) = 0,41

#### 1.4 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS E OS RESULTADOS LABORATORIAIS EM PACIENTES COM M.R.

Com o objetivo de estudar as possíveis discordâncias entre os dados clínicos e os resultados das provas laboratoriais, submetemos os resultados ao teste Q de Cochran (Tabela X). Para realizar este teste, atribuímos o valor "1" (um) para as provas com resultados positivos ou alterados ou com manifestações clínicas presentes e o valor "0" (zero), para os casos de resultados laboratoriais negativos ou manifestações clínicas ausentes. O teste Q de Cochran mostrou discordâncias significantes quanto aos resultados dos exames clínicos e laboratoriais.

Com o objetivo de estudar relações entre esses resultados, tomados dois a dois, realizamos um estudo comparativo, considerando agora os resultados da dosagem do fragmento Ba e a relação C4d/C4 com as demais. Para isso, utilizamos o teste de McNemar, cujos resultados analisáveis são apresentados no Anexo 7. O teste mostrou discordâncias significantes entre o resultado do exame clínico e das provas laboratoriais com C4d/C4 e o fragmento Ba, com exceção da cardite e níveis de Ba (discordância não-significante).

TABELA X - RESULTADO DO EXAME CLÍNICO E DAS PROVAS LABORATORIAIS EM PACIENTES COM MOLÉSTIA REUMÁTICA.

PACIENTES	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Nº	CARDITE	ARTRITE	CORÉIA	MUCOPROTEÍNAS	PROTEÍNA C-REATIVA	VHS	LEUCÓCITOS	Ba	C4d/C4
1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
2	1	1	0	1	1	1	0	1	1
3	0	1	0	1	1	1	1	1	1
4	0	1	0	1	1	1	1	1	1
5	1	1	0	1	0	1	0	0	1
6	1	1	0	1	1	1	1	1	1
7	0	1	0	1	1	0	1	0	1
8	1	1	0	1	1	1	1	0	1
9	0	1	0	1	1	1	1	0	1
10	0	1	0	1	1	0	1	1	1
11	0	1	0	1	1	0	1	0	1
12	0	1	0	1	1	1	1	0	1
13	1	1	0	1	1	1	1	1	1
14	1	1	0	1	1	1	1	1	1
15	0	1	0	1	0	1	1	0	1
16	0	0	1	0	0	1	0	0	1
17	0	0	1	0	1	1	1	0	1
18	1	1	1	0	0	1	1	0	1
19	1	1	0	1	1	1	0	0	1
20	1	1	0	1	1	0	1	1	1
21	1	0	0	1	1	1	1	1	1
22	0	1	0	1	1	1	1	1	1
23	1	0	0	1	0	1	1	0	1
24	0	1	0	1	0	1	1	0	1
SOMA	11	20	3	21	18	20	20	10	24

Teste Q de Cochran

Q calculado = 64,28 \*

 $\chi^2$  crítico (8 gl; 0,05) = 15,51

## 1.5 - DOSAGEM DE IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES

### 1.5.1 - Pacientes com Moléstia Reumática

Em 24 pacientes foram pesquisados os níveis de ICs circulantes. Procurou-se fazer a dosagem dos ICs circulantes nas amostras colhidas do 1º dia, 3º mês e 6º mês. Dificuldades técnicas não permitiram que em todos esses períodos fosse possível a dosagem, ficando alguns sem os respectivos valores.

A porcentagem de positividade para ICs circulantes, considerando o 1º dia, pelo método FRm (acima de 5,2% de precipitação), foi de 5,5% (1 em 18), com normalização da cifra na dosagem seguinte. Pelo método da congulinina (acima de 7,4% de ligação), a positividade foi de 10,5% (2 em 19), com normalização das cifras nas dosagens seguintes (Anexo 6).

### 1.5.2 - Grupo-Controle

O ensaio do fator reumatóide monoclonal (FRm) foi aplicado a 32 soros-controles, estabelecendo-se como limite superior da normalidade o valor 5,2% de precipitação  $^{125}\text{I}$ -FRm ( $\bar{X} = 2,52; \pm 1,35$ ). O ensaio da congulinina foi aplicado a 31 soros-controles e considerou-se como limite superior da normalidade o valor de 7,4% de ligação à congulinina ( $\bar{X}=3,24; \pm 1,40$ ). Os resultados são apresentados na Figura 9 e maiores dados são fornecidos no Anexo 5.

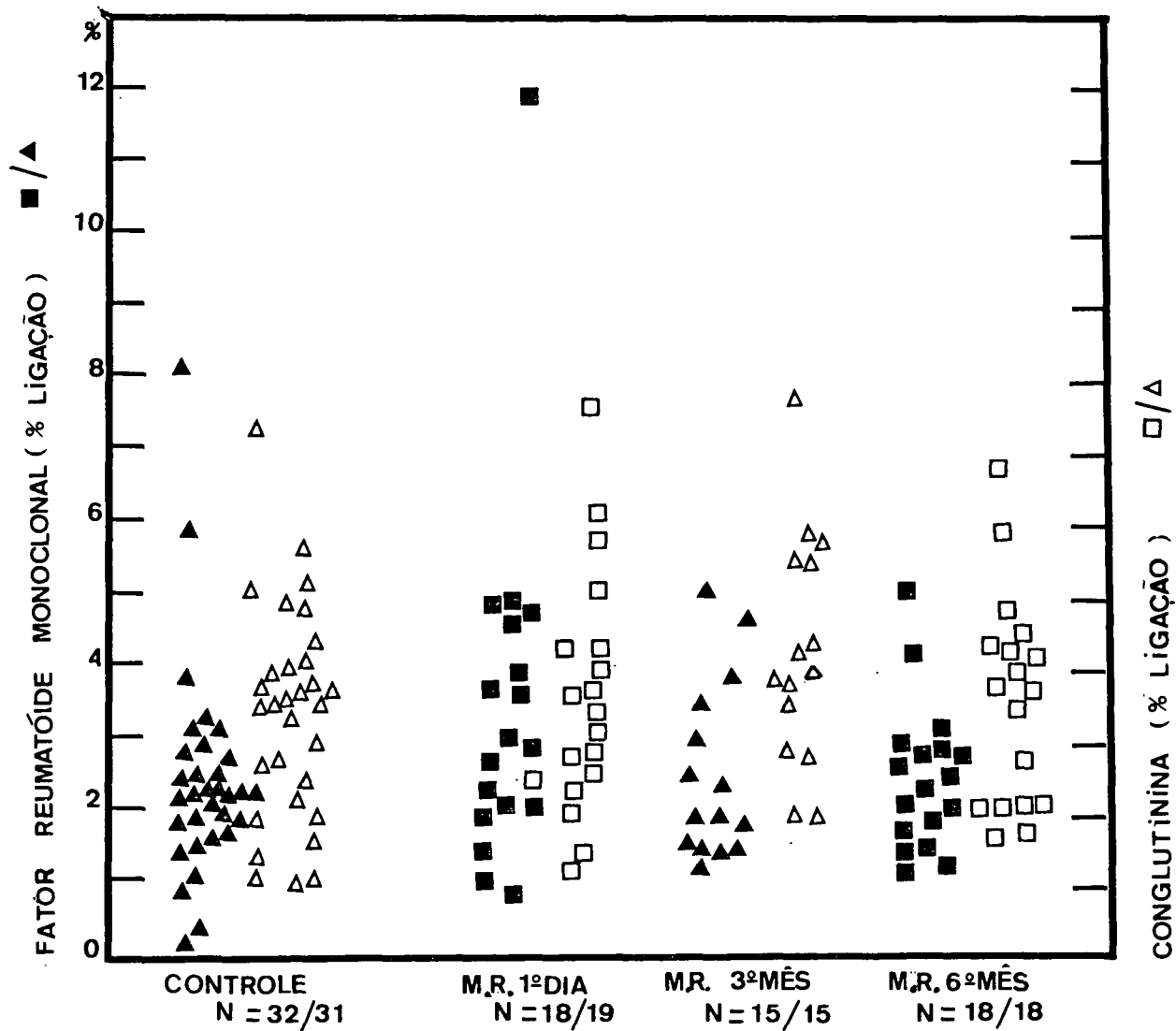


FIGURA 9 - Dosagem de imunecomplexos circulantes em indivíduos do grupo-controle e em pacientes com M.R., usando-se o ensaio do fator reumatóide monoclonal e da conglutininina (não-significante).  
N = número de pacientes.

### 1.6 - DOSAGEM DE CH<sub>50</sub>, C3 e C4

Pela disponibilidade de soro, em 17 pacientes foram dosados o CH<sub>50</sub>, C3 e C4, nas amostras colhidas no 1º dia e no 6º mês. Todos os pacientes apresentaram, nas amostras do 1º dia, níveis de CH<sub>50</sub> acima de 60 unidades (valor normal = 60 a 108 u); no 6º mês 15 permaneceram com os níveis acima de 60 u, enquanto 2 tiveram seus níveis abaixo desse valor (Tabela XI).

O nível de C3 sérico (valor normal = 55 a 120 mg%) nas 16 amostras do 1º dia estava normal em 8 pacientes, elevado em 7 e baixo em 1. Nas amostras do 6º mês, apenas 2 pacientes mostraram os níveis de C3 inferiores à normalidade (Tabela XI).

O componente C4 (valor normal = 20 a 50 mg%), estudado nas 16 amostras de soro do 1º dia, mostrou valores normais, com exceção de 4 pacientes, sendo elevado em 3 e diminuído em 1 deles. No 6º mês, dois pacientes mostraram valor de C4 diminuído (Tabela XI).

TABELA XI - DOSAGEM DE CH<sub>50</sub>, C3 e C4 EM PACIENTES COM M.R., NAS AMOSTRAS DO 1º DIA E 6º MÊS.

PACIENTES	CH <sub>50</sub> u		C3 mg%		C4 mg%	
	1º dia	6º mês	1º dia	6º mês	1º dia	6º mês
1	128	85	159	96	31	22
2	87	43	94	44	20	20
3	88	48	126	64	54	39
4	107	79	147	91	51	22
5	132	69	116	56	46	33
7	116	91	111	68	26	22
10	115	102	82	68	45	43
11	93	79	200	106	34	25
13	70	76	62	111	10	15
15	117	83	153	64	77	45
16	75	93	48	74	29	35
19	78	96	90	52	30	48
20	91	77	142	107	22	18
21	89	68	159	96	44	44
22	103	86	60	70	43	26
23	97	125	77	91	21	46
24	82	78	ND	101	ND	20

ND = Não-Determinado

## VII - DISCUSSÃO



Demonstramos haver ativação do sistema do complemento na moléstia reumática, por ambas as vias, clássica e alternativa.

O interesse no estudo do complemento nas doenças prende-se a evidências clínicas e experimentais de que o complemento está envolvido em vários mecanismos de lesão tecidual. Uma das dificuldades que existem nesta área é saber a importância relativa do complemento na etiopatogênese de processos onde sabidamente há utilização do complemento. Esta dificuldade ocorre porque, no mesmo paciente, são ativados também outros sistemas amplificadores e efetores da resposta inflamatória<sup>20, 29, 92, 100</sup>. Os métodos de avaliação da ativação do complemento ajudam na análise das questões de importância e relevância do complemento em doenças.

Originalmente descrito como uma substância termolábil no soro normal, necessário para provocar lise de bactérias e de eritrócitos recobertos por anticorpos, o sistema do complemento foi, aos poucos, sendo conhecido como um grupo complexo de proteínas que amplifica uma série de efeitos inflamatórios<sup>92, 100</sup>.

O papel fisiológico do complemento na manutenção do estado normal de saúde é mostrado pela predisposição à doença ou pela suscetibilidade a infecções que caracterizam algumas deficiências congênitas ou adquiridas de certos componentes do complemento ou de seus reguladores no homem<sup>6, 8, 20, 72, 87, 92, 98</sup>.

Se, por um lado, a presença do complemento é necessária para a homeostase e defesa contra infecções, a ativação do sistema do complemento, quer pela via clássica, quer pela via alternativa, pode provocar uma série de efeitos deletérios. Estes efeitos são geralmente resultantes de ações biológicas dos produtos de clivagem do complemento<sup>8, 29</sup>.

O envolvimento do complemento nas doenças reumáticas tem sido extensivamente investigado, principalmente na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico; entretanto, o conhecimento da sua participação no processo fisiopatológico da moléstia reumática é ainda incipiente<sup>8, 20, 23, 32, 64, 82, 98</sup>.

Apesar da reconhecida relação entre a ocorrência da moléstia reumática e infecção estreptocócica prévia, a patogênese dessa infecção permanece obscura<sup>16, 71, 95, 116, 124-125</sup>.

Evidências experimentais sugerem a implicação de um fenômeno auto-imune, sendo aceita a presença de auto-anticorpos contra estruturas cardíacas<sup>15, 31, 37, 48-49, 71, 90</sup>, de imunecomplexos circulantes em concentrações semelhantes àsquelas encontradas na glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica<sup>83, 96, 109</sup> de depósitos de imunecomplexos em valvas cardíacas<sup>48, 106</sup> e da ativação do complemento no líquido sinovial de pacientes com poliartrite<sup>83, 106</sup>.

A patogênese da reação inflamatória, também, constitui-se em um ponto de controvérsia. O estudo da participação do sistema do complemento, na mediação desta resposta na M.R., tem sido motivo de desacordo entre vários autores<sup>32, 82-83, 106</sup>. Alguns relataram uma diminuição nos níveis do complemento, com normalização posterior, enquanto outros detectaram níveis normais ou discretamente diminuídos ou, mesmo, aumentados. Pela discrepância dos dados obtidos no estudo do complemento, tem-se procurado investigar outros fatores que elucidam a patogênese da inflamação nesta doença, justificando alguns autores, inclusive, que se trataria de um fenômeno independente da ativação desse sistema. Interroga-se, então, a mediação da resposta inflamatória por ativação do fator de Hageman, fibrinólise, coagulação intrínseca, linfotoxicidade, função macrofágica anormal,

etc.<sup>40, 80-81-82, 89, 100.</sup>

Reyes et alii<sup>82</sup> mostraram que os níveis de complemento sérico em pacientes com moléstia reumática aguda eram normais, mas não afastaram a possibilidade de uma ativação do sistema do complemento em andamento, balanceada por um aumento relativo e por um possível consumo do mesmo. Deixaram claro, nos seus estudos, que os resultados obtidos não são definitivos, sugerindo um estudo metabólico dos componentes do complemento purificados ou com componentes "radiomarcados".

A variedade de resultados obtidos por diferentes investigadores pode ser, em parte, atribuída às diversas técnicas empregadas e à sua pouca reprodutibilidade e sensibilidade.

A determinação do produto de clivagem C4d/C4 e a dosagem do fragmento Ba, através de técnicas altamente sensíveis, são indicadores de ativação das vias clássica e alternativa, respectivamente. O mesmo não se pode dizer, no entanto, da determinação dos níveis do complemento através de técnicas de CH<sub>50</sub>, ou de um dos seus componentes ou fatores (C1, C2, C3, C4, fator B), métodos utilizados nos trabalhos anteriores<sup>32, 80, 117.</sup>

O objetivo principal do nosso trabalho, que era determinar se há envolvimento de uma ou mais vias de ativação do complemento em pacientes com moléstia reumática aguda, foi alcançado.

Nesta pesquisa, demonstramos que existe, na moléstia reumática, ativação de ambas as vias do sistema do complemento. Esta assertiva baseia-se na avaliação dos produtos de clivagem, pois também em nossos pacientes os níveis de complemento sérico mantiveram-se dentro da faixa de normalidade, através das medidas de CH<sub>50</sub>, C3 e C4, mostrando claramente que estas dosagens

não podem ser utilizadas como indicadores de ativação do complemento.

A ativação de cada via do sistema complemento ocorre de uma forma independente, uma vez que não houve correlação significativa entre os níveis do fragmento Ba e a relação C4d/C4. É importante ainda observar que a maioria dos pacientes com níveis de C4d/C4 elevados no plasma não apresentavam níveis detectáveis de fragmento Ba.

A ativação da via clássica está presente não só na fase aguda da doença (1º dia), mas também após a remissão da atividade clínica (3º e 6º mês). No 6º mês, ainda persiste maior ativação do complemento em pacientes com moléstia reumática do que em indivíduos normais.

Entretanto, fazendo a comparação do grupo de pacientes nos vários períodos estudados pela dosagem do fragmento Ba, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre eles, o mesmo acontecendo entre o grupo-controle e o grupo de pacientes com moléstia reumática no 3º e 6º mês. Portanto, há um declínio na ativação da via alternativa, evidenciado pela dosagem do fragmento Ba.

Os valores de mucoproteínas, VHS e proteína C-reativa normalizaram-se com a evolução clínica, mesmo nos pacientes em que houve permanência da ativação do complemento. Podemos concluir, com estes dados, que as provas de ativação do complemento são provavelmente mais sensíveis do que aqueles exames laboratoriais, para indicar lesão subclínica da doença, pois eles já estavam normais na maioria dos pacientes no 3º e 6º mês, e ainda havia níveis elevados da relação C4d/C4, em vários pacientes.

A diminuição dos níveis da relação C4d/C4 na evolução da doença é mais um índice de regressão da atividade inflamatória. Nos casos de cardite grave (pacientes nºs 5, 14, 18, 19, 23), tal diminuição não ocorreu, talvez indicando a manutenção a mais longo prazo de uma atividade inflamatória não-detectada por exames laboratoriais de rotina. Tem sido demonstrado que existe atividade histológica de moléstia reumática no coração, mesmo em pacientes sem crises de moléstia reumática aguda<sup>3</sup>.

Observamos, ainda, um aumento da relação C4d/C4 no 24º paciente com moléstia reumática, sem evidência clínica de cardite em atividade. Neste paciente, em particular, houve, no 6º mês, um quadro de infecção das vias aéreas superiores (amigdalite aguda), com alterações nas provas de atividade inflamatória, o que dificultou a interpretação dos resultados.

Não observamos elevação dos níveis de fragmento Ba na maioria dos pacientes com cardite grave.

A determinação dos produtos de clivagem do complemento pela imunoeletroforese "em foguete" é um método mais sensível na avaliação do sistema do complemento do que as medidas de CH<sub>50</sub>, C3 e C4.

A medida de CH<sub>50</sub> fornece-nos evidências indiretas de ativação do complemento. Há necessidade de uma diminuição de 50 - 80% nos níveis normais dos componentes para termos valores alterados. Além do mais, a técnica de CH<sub>50</sub> requer reagentes especiais e não é feita de rotina em muitos laboratórios.

Os níveis de C3 e C4 plasmáticos podem estar dentro dos limites da normalidade, sem termos evidências de que está havendo uma maior síntese e um maior consumo.

Outro problema com o CH<sub>50</sub>, C3 e C4 é a larga faixa de

valores normais na população.

Quanto à dosagem de  $CH_{50}$ , C3 e C4 nos nossos pacientes, nas amostras do 1º dia e 6º mês, verificamos que nesses exames laboratoriais os pacientes apresentavam os níveis séricos de complemento predominantemente dentro da faixa de normalidade estabelecida para nosso laboratório tanto para  $CH_{50}$  (VN= 63 a 180u), como para C3 (VN= 55 a 120 mg%) e C4 (VN= 20 a 50 mg%).

O teste de Cochran mostrou discordância significativa entre o exame clínico e os exames laboratoriais. Baseado neste resultado, realizamos também um estudo comparativo, considerando os resultados da dosagem do fragmento Ba e a relação C4d/C4 com as manifestações clínicas e os exames laboratoriais. Dos resultados analisáveis, a única manifestação clínica que apresentou discordância não-significante com a dosagem do fragmento Ba foi a cardite, embora um maior número de pacientes garantiria maior validade a este achado. Conclui-se que não é prudente substituir o exame clínico e os outros exames laboratoriais pelos resultados da dosagem do fragmento Ba e a relação C4d/C4.

Dentro do comprometimento não-cardiovascular que ocorre nos pacientes com moléstia reumática aguda, podemos referir ainda, com base nos resultados dos exames que temos, as alterações que ocorrem nas chamadas provas de função hepática e urinálise. O achado de valores normais das enzimas transaminases oxalacética e pirúvica na moléstia reumática tem sido relatado na literatura<sup>60, 126</sup>. Muitas publicações têm sugerido que o ácido acetilsalicílico poderia ser a causa de lesão hepática e não o comprometimento pela doença básica. Estas anormalidades desenvolver-se-iam após uma semana de tratamento com aquela medicação e seriam persistentes. Em nossos pacientes, não foram evi-

denciadas anormalidades hepatocelulares, através dos exames laboratoriais realizados, mesmo durante o acompanhamento dos mesmos. Anormalidades renais, que ocorrem na moléstia reumática, também têm sido relatadas<sup>10, 41</sup>, embora estas anormalidades sejam efêmeras, sem maiores preocupações. Proteinúria, micro-hematúria ou cilindrúria não foram observadas em nossos pacientes.

O papel patogênético do complemento na moléstia reumática ainda não está bem elucidado. Sabemos que há uma associação entre o processo inflamatório na moléstia reumática e ativação do complemento, mas não sabemos até que ponto as lesões teciduais que ocorrem são decorrentes primariamente da ação do complemento ou de outros sistemas mediadores da inflamação.

Mostramos a aplicabilidade da imunoeletroforese "em foguete" no estudo da ativação do complemento na moléstia reumática aguda. Outras doenças estão sendo investigadas no laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, por esta técnica<sup>63</sup>.

Em nosso trabalho, procuramos também avaliar a ocorrência dos imunecomplexos circulantes na moléstia reumática e correlacionar estatisticamente com os níveis de produtos de ativação de complemento.

Em outras doenças reumáticas, os imunecomplexos ocorrem com freqüência, especialmente na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico. Esta ocorrência é baseada na demonstração de imunecomplexos no sangue, em vários líquidos extracelulares e em alguns tecidos<sup>54-55, 70, 73, 128</sup>.

Tem havido grande variabilidade de resultados quanto à incidência dos imunecomplexos circulantes na moléstia reumática, nos trabalhos publicados<sup>42, 83, 106, 116</sup>.

A participação dos imunecomplexos na manifestação de artrite nos pacientes com moléstia reumática aguda foi sugerida por Svartman et alii<sup>106</sup>. Eles encontraram no líquido sinovial, obtido de crianças com M.R. aguda, uma diminuição dos componentes Clq, C3 e C4, mostrando uma forte evidência de ativação do complemento dentro das articulações, sugerindo que tal ativação seria por imunecomplexos.

Van de Rijn et alii<sup>83</sup>, também, estudaram a incidência dos imunecomplexos circulantes nos pacientes com moléstia reumática aguda, em pacientes com glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica e com impetigo sem nefrite. A positividade de imunecomplexos circulantes no soro de pacientes com M.R., utilizando o ensaio Clq em fase sólida e o ensaio de células Raji, foi de 81% e 89%, respectivamente. Foi surpresa para eles que pacientes com M.R. tivessem uma incidência de imunecomplexos no soro similar à de pacientes com glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, desde que a M.R. não é considerada uma doença por imunecomplexos. Seus dados foram comparados com os de outros autores, que utilizaram as mesmas técnicas, mas nenhum deles reportou a presença de imunecomplexos na M.R.. Eles interrogam se os imunecomplexos da moléstia reumática são os mesmos da glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, se há mais de um ou, mesmo, prevêem a necessidade de determinar a natureza dos antígenos dos imunecomplexos nessas duas doenças.

Uma alta positividade de imunecomplexos também foi encontrada por William et alii<sup>119</sup>, em pacientes com cardite reumática e com coréia de Sydenham, usando os dois métodos (o ensaio do Clq e o ensaio de células Raji). A possível patogenicidade destes imunecomplexos na cardite reumática e na coréia de Sy-



denham não ficou determinada.

Mais recentemente, Ueki et alii<sup>112</sup> demonstraram a presença de C3 nas junções dermo-epidérmicas e nas papilas dérmicas no eritema marginado. Não puderam decidir, contudo, se a presença do C3 intradérmico representa imunecomplexos, ou se a deposição ocorre por ativação da via alternativa independente do anticorpo.

Os níveis de imunecomplexos no soro de 42 pacientes com moléstia reumática foram determinados pelas técnicas de precipitação com PEG 3,5% e Clq-ELISA. Os resultados confirmaram a existência de imunecomplexos nesses pacientes, mas ocorrendo em uma menor porcentagem (PEG= 33% e Clq-ELISA= 21,4%)<sup>42</sup>.

Com esta variabilidade de resultados descritos, poderíamos fazer uma análise crítica. Seria simplesmente um problema de metodologia empregada ou, de fato, os imunecomplexos circulantes estão presentes em boa porcentagem de pacientes com M.R. Muitas técnicas são descritas para a detecção dos imunecomplexos circulantes, mas ainda não existe uma que seja, ao mesmo tempo, específica, sensível e facilmente reprodutível, capaz de detectar os imunecomplexos em todas as classes de imunoglobulinas, fixadoras ou não de complemento, e de todos os tamanhos. Diferenças existem na sensibilidade das técnicas utilizadas, sensibilidade que varia de doença para doença.

Foi encontrada, em nosso trabalho, uma baixa positividade de imunecomplexos circulantes: 5,5% pelo ensaio da congutina e 10,5% pelo ensaio do fator reumatóide monoclonal. Este achado, discordante daqueles da literatura revista, poderia ser explicado pelas seguintes hipóteses:

- 1) os imunecomplexos estariam presentes apenas intermitentemen-

te na circulação e, assim, sua detecção seria influenciada pela época da realização da pesquisa;

2) os imunecomplexos não estariam presentes em todos os pacientes, porque não seriam o evento primário, mas apenas consequência de uma reação inflamatória;

3) variação da resposta do hospedeiro na formação dos imunecomplexos; e

4) falta de sensibilidade dos métodos por nós empregados para este tipo de imunecomplexos e, além disso, haveria pequenas quantidades de imunecomplexos circulantes.

Esta falta de sensibilidade é a hipótese que nos parece mais plausível, em vista da evidência da presença de imunecomplexos pela técnica de células Raji e de ligação de Clq. As técnicas por nós usadas mostram alta frequência de positividade em outras doenças reumáticas, tais como o lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide com doença ativa, reduzindo-se os níveis com a remissão do quadro clínico<sup>54, 70, 73, 128</sup>.

Como podemos observar, a literatura mostrou maior porcentagem de positividade de imunecomplexos circulantes que a obtida em nosso estudo. As técnicas por eles utilizadas também estão sujeitas a várias interferências: Clq liga-se, além dos imunecomplexos, a DNA, endotoxinas, proteína C-reativa. Anticorpos antilinfocitários podem induzir falso-positivos no ensaio das células Raji. Tais anticorpos estão frequentemente presentes no soro de pacientes com doenças auto-imunes<sup>96</sup>.

A detecção de imunecomplexos nos fluidos biológicos não indica, necessariamente, que a enfermidade em estudo resulte desses imunecomplexos. Há necessidade de sua demonstração nos tecidos lesados e a relação de sua deposição tissular e o apa-

recimento da lesão.

Na moléstia reumática, permanece para ser determinada a fisiopatogenia do processo inflamatório que ocorre nas valvas cardíacas, no pericárdio, no miocárdio, bem como os distúrbios neurológicos encontrados na coréia de Sydenham. A detecção de imunecomplexos circulantes no soro e sua deposição em tecidos não explica como ou por que estes imunecomplexos são depositados ou adsorvidos nas valvas, sem haver outros tecidos envolvidos. Prova definitiva de que esses depósitos são realmente imunecomplexos existe para poucas doenças, como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico.

É sabido que os imunecomplexos circulantes podem ativar o sistema do complemento, tanto pela via clássica como pela via alternativa, e quanto maior o nível de imunecomplexos na circulação, maior o consumo de complemento.

A baixa positividade de imunecomplexos circulantes em pacientes com moléstia reumática aguda, em nosso estudo, revela que, provavelmente, o sistema do complemento não foi por eles ativado diretamente, embora a análise estatística nesse sentido não pudesse ter sido feita pelo baixo número de pacientes com níveis elevados de imunecomplexos circulantes.

Muitos estudos ainda devem ser feitos para explicar o mecanismo da fisiopatogenia da M.R.. Sabemos que há uma resposta celular e humoral alterada aos antígenos estreptocócicos nos pacientes com M.R. e de que uma suscetibilidade genética poderia ter um papel importante na doença, mas a patogênese desta permanece um enigma.

Ironia maior é pensar que é uma doença em vias de desaparecimento sem que a entendamos completamente.

## VIII - CONCLUSÕES

1. Demonstramos evidência, na moléstia reumática aguda, de ativação de ambas as vias do sistema do complemento, clássica e alternativa.
2. Não houve correlação significativa entre os níveis do fragmento Ba e a relação C4d/C4, o que mostra que as duas vias de ativação se desenvolvem independentemente.
3. Na maioria dos pacientes, a melhora da atividade clínica da doença é acompanhada pela queda da relação C4d/C4 plasmática.
4. Na presença de cardite grave, não ocorre redução da relação C4d/C4, indicando a manutenção, por mais longo tempo, da atividade inflamatória, não-detectada pelos exames laboratoriais comuns.
5. Não houve correlação entre os níveis de produtos circulantes de ativação do complemento com os indícios clínicos e laboratoriais de atividade da doença.
6. Encontrou-se baixa positividade de imunecomplexos na presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AASTED, B.; BERNSTEIN, D.; KLAPPER, D.G.; KHOLY, A.E.; KRAUSE, R.M. Detection of antibodies in human sera to streptococcal groups A and C carbohydrates by a radioimmunoassay. Scand. J. Immunol., Oslo, 9: 61-7, 1978.
2. ARGUELLES, E. Quadro Clínico da Fase Aguda da Febre Reumática. Ars Cvrandi, São Paulo, 15:95-132, 1982.
3. ARGUELLES, E.; FISZMAN, P.; FAKOURY, L. In: \_\_\_\_\_. Febre Reumática e doenças valvulares do coração. Rio de Janeiro, Intermédica, 1984, 673 p.
4. ARMAS, S.N. Fiebre reumática y enfermedad reumática del corazón. Caracas. Fondo Editorial Comun., 1977, 429 p.
5. ARROYAVE, C.M. & TAN, E.M. Detection of complement activation by counterimmunoelectrophoresis (CIE). J. Immunol. Methods, Amsterdam, 13:101-12, 1976.
6. ATKINSON, J.P. & FRANK, M.M. Complement. In: PARKER, C.W., ed. Clinical Immunology. Philadelphia, Saunders, 1980. V.1, p. 219-64.
7. AXELSEN, N.H.; KROLL, I.; WEEKE, B. eds. A manual of quantitative immuno-electrophoresis; methods and applications. Scand. J. Immunol., Oslo, 2(Suppl. 1):1-169, 1973.
8. BALLA, A.A.A.K. Ativação do fator B da via alternativa do complemento. São Paulo, 1983. 124 p. Tese, Doutorado. Escola Paulista de Medicina.
9. BALLA, A.; MILGROM, H.; DEHEER, D.; VAUGHAN, J.H.; MÜLLER-EBERHARD, H. J.; CURD, J.G. Activation of C4: Quantitation by rocket immuno-electrophoresis and correlation with the activity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., Atlanta, 23:65, 1980. Resumo.
10. BARNERT, A.L.; TERRY, E.E.; PERSELLIN, R.H. Acute rheumatic fever in adults. JAMA, Chicago, 232:925-8, 1975.
11. BARRAT, J. & NAISH, P. A simple radiolabelled rheumatoid factor binding assay for the measurement of circulating immune complexes. I. Immunol. Methods, Amsterdam, 25:137-46, 1979.
12. BERGNER-RABINOWITZ, S.; FLEIDERMAN, S.; FERNE, M.; RABINOWITZ, K.; GINSBURG, I. The new Streptozyme test for streptococcal antibodies. Clin. Pediatr., Philadelphia, 14:804-9, 1975.

13. BIER, O. Estreptococos. In: \_\_\_\_\_. Bacteriologia e imunologia, 17 ed. São Paulo, Melhoramentos, 1976, p. 417-29.
14. BIER, O.; DIAS DA SILVA, I.M.; VAZ, N.M. Complemento. In: Imunologia básica e aplicada, 3. ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 1982, p. 149-70.
15. BISNO, A.L. & STOLLERMAN, G.H. Streptococcal antibodies in the diagnosis of rheumatic fever. In: COHEN, A.S., ed. Laboratory diagnostic procedures in the rheumatic diseases. 2. ed. Boston, Little Brown. 1975. p. 207-63.
16. BLACHER, C.; ZIELISNKY, P.; LEÃES, P.E.; TORRES NETTO, E.; RODRIGUES, R. Doença reumática ativa. Estudo prospectivo. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, 39:373-5, 1982.
17. BLOCH, K.J.; SALVAGGIO, J.E. Use and interpretations of diagnostic immunologic laboratory tests. JAMA, Chicago, 248:2734-58. 1982.
18. BOARETTI, A.C. Laboratório em Reumatologia, In: RACHID, A. & VERZTMAN. Reumatologia Pediátrica. Rio de Janeiro, Schering, 1977. p. 29-39.
19. CALDWELL, J.L. & KALTREIDER, H.B. Febre Reumática Aguda. In: FUDENBERG, H.H.; STITES, D.D.; CALDWELL, J.L.; WELLS, J.V. Imunologia Básica e Clínica. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1980. p. 548-53.
20. COOPER, N.R. O Sistema Complemento. In: FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L.; WELLS, J.V. Imunologia Básica e Clínica. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1980. p. 63-74.
21. COPE, J.B.; REDYS, J.J.; RANDOLPH, M.F. A comparison of two streptococcal antibody levels in posttreatment carriers of group A streptococci. Clin. Pediatr., Philadelphia, 15:1120-2, 1975.
22. CUNHA, G.P. & BOARETTI, A.C. Doença Reumática. In: RACHID, A. & VERZTMAN, L. Reumatologia Pediátrica. Rio de Janeiro, Schering, 1977. p. 129-72.
23. CURD, J.G. Assessment of complement activation in plasma. In: NAKAMURA, R.M.; DITO, W.R.; TUCKER III, E.S. Immunologic Analysis. Recent progress in diagnostic laboratory immunology. La Jolla, California, Masson-Publishing, 1982. p. 215-25.
24. DÉCOURT, L.V. Provas serológicas na doença reumática ativa. Estudo crítico. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, 27:599-607, 1974.
25. \_\_\_\_\_. Doença Reumática. 19 Encontro sobre medicina preventiva em cardiologia. São Paulo, Instituto do Coração do Hospital de Clínicas da FMUSP, 1978, 151p.
26. \_\_\_\_\_. Doença Reumática. Ars Cvrandi Cardiol., São Paulo, 4(24):10-66, 1982.
27. DISCIASCIO, G. & TARANTA, A. Rheumatic fever in children. Am. Heart J., St. Louis, 99:635-58, 1980.
28. DIXON, F.J. The role of antigen-antibody complexes in disease. Harvey Lect., New York, 58:21-52, 1963.



29. EMMANCIPATOR, S.N.; LAMM, M.E. Pathways of tissue injury initiated by humoral immune mechanisms. Lab. Invest., Baltimore, 5:475-8, 1986. Editorial.
30. FEARON, D. & AUSTEN, K.F. Current concepts in Immunology. The alternative pathway of complement - A system for host resistance to microbial infection. N. Engl. J. Med., Boston, 303:259-63, 1980.
31. FINK, J.N. & FAUCI, A. Immunologic aspects of cardiovascular disease. JAMA, Chicago, 248:2716-21, 1982.
32. FISCHER, E.E.; PAULI, R.H.; LESH, J. Serological studies in rheumatic fever. II. Serum complement in the rheumatic state. J. Clin. Invest., New Haven, 28:1172-81, 1949.
33. FRANKEL, S.; REITMAN, S.; SONNENWIRTH, A.C. Grandwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 7. ed. Saint Louis, Mosby, 1970. 2 V.
34. FUJITA, T.; GIGLI, I.; NUSSENZWEIG, V. Human C4-Binding Protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. J. Exp. Med., New York, 148:1044-51, 1978.
35. GILLILAND, B.C. Clinical Immunology. Complement System. In: ISSELBACHER, K.L.; ADAMS, R.D.; BRAUNWALD, E.; PETERSDORF, R.G.; WILSON, J.D. Harrison's Principles of Internal Medicine. 9. ed. Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, 1980. p.322-5.
36. GILLILAND, B.C. & MANNIK, M. Immune-Complex Diseases. In: ISSELBACHER, K.J.; ADAMS, R.D.; BRAUNWALD, E.; PETERSDORF, R.G.; WILSON, J.D. Harrison's Principles of Internal Medicine. 9.ed. Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, 1980. p. 347-51.
37. GLYNN, L.E. Rheumatic Fever. In: GELL, P.G.H.; COOMBS, R.R.A.; LACHMANN, P.J., eds. Clinical Aspects of Immunology. 3. ed. Oxford, Blackwell, 1975, p. 1079-98.
38. GOLDENBERG, J.; ATRA, E.; NASPITZ, C.K.; SOLÉ, D.; JARCEW Jr., N. Coréia de Sydenham. Estudo de 16 casos. Rev. Bras. Reumat., São Paulo, 23: 163-6, 1983.
39. GÜTZE, D. & MÜLLER-EBERHARD, H.J. The C3 activation system: An alternative pathway of complement activation. J. Exp. Med., New York, 134: 90-108, 1971.
40. GRAY, E.D.; WANNAMAKER, L.W.; AYOUB, E.M.; KHOLY, A.E.; ABDIN, Z.H. Cellular immune responses to extracellular streptococcal products in rheumatic heart disease. J. Clin. Invest., New York, 68:665-71, 1981.
41. GRISHMAN, E.; COHEN, S.; SALOMON, M.I.; CHURG, J. Renal lesions in acute rheumatic fever. Am. J. Pathol., Chicago, 51:1045-53, 1967.
42. GUPTA, R.C.; BADHWAR, A.K.; BISNO, A.L.; BERRIOS, X. Detection of C-reactive protein, streptolysin O, and anti-streptolysin O antibodies in immune complexes isolated from the sera of patients with acute rheumatic fever. J. Immunol., Baltimore, 137:2173-9, 1986.

43. HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. Non parametric statistical methods. New York. John Wiley, 1973, 253 p.
44. HUNTER, G.G.; McDUFFIE, F.C.; MULLEN, B.J. Activation of complement components C3 and factor B in synovial fluids. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, 89:160-71. 1977.
45. HUNSICKER, L.G.; RUDDY, S.; CARPENTER, C.B.; SCHUR, P.H.; MERRIL, H.J.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; AUSTEN, K.F. Metabolism of third complement component (C3) in nephritis. N. Engl. J. Med., Boston, 287:835-40, 1972.
46. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Os estreptococos. In: \_\_\_\_\_. Microbiologia Médica, 13. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1980. p. 178-84.
47. KAPLAN, E.L. Febre Reumática Aguda. Clin. Pediatr. Am. Norte, Rio de Janeiro, p. 821-33, nov. 1978.
48. KAPLAN, M.H.; BOLANDE, R.; RAKITA, L.; BLAIR, J. Presence of bound immunoglobulins and complement in the myocardium in acute rheumatic fever. New Engl. J. Med., Boston, 271:637-45, 1964.
49. KAPLAN, M.H. & DALLENBACH, F.D. Immunologic studies of heart tissue: III. Occurrence of bound gamma globulin in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. J. Exp. Med., New York, 113:1-15. 1961.
50. KAPLAN, M.H.; MEYESERIAN, M.; KUSHNER, I. Immunologic studies of heart tissue. IV. Serologic reactions with human heart tissue as revealed by immunofluorescent methods: isoimmune Wassermann and autoimmune reactions. J. Exp. Med., New York, 113:17-35, 1964.
51. KAPLAN, M.H. & RAKITA, L. Myocardial Disease. In: TALMAGE, D.W.; ROSE, B.; AUSTEN, K.F.; VAUGHAN, J.H. eds. Immunological Diseases. 3. ed. Boston, Little Brown, 1978, V. 2, p. 1502-20.
52. KAPLAN, R.A.; CURD, J.G.; DEHEER, D.H.; CARSON, D.A.; PANGBURN, M.K.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; VAUGHAN, J.H. Metabolism of C4 and factor B in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., Atlanta, 23:911-20, 1980.
53. LACHMANN, P.J.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; KUNKEL, H.G.; PARONETTO, F. The localization of in vivo bound complement in tissue sections. J. Exp. Med., New York, 115:63-82, 1962.
54. LAMBERT, P.H. & CASALI, P. Immune Complexes and the rheumatic diseases. Clin. Rheum. Dis., London, 4:617-42, 1978.
55. LAMBERT, P.H.; DIXON, F.J.; ZUBLER, R.; AGNELLO, V.; CAMBIASO, C.; CASALI, P.; CLARKE, J.; COWDERY, J.S.; McDUFFIE, F.C.; HAY, F.C.; MACLENNAM, I.C.M.; MASSON, P.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; PENTTINEN, K.; SMITH, M.; TAPPEINER, G.; THEOFILOPOULOS, A.N.; VERROUST, P. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods of detecting immune complexes in serum. J. Clin. Immunol., New York, 1:1-15, 1978.

56. LAURELL, C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in gel containing antibodies. Anal. Biochem., New York, 15:45-52, 1966.
57. LESAVRE, P.H. & MÜLLER-EBERHARD, H.J. Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway. J. Exp. Med., New York, 148: 1498-509, 1978.
58. LESAVRE, P.H.; HUGJI, T.E.; ESSER, A.F.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The alternative pathway C3/C5 convertase: chemical basis of factor B activation. J. Immunol., Baltimore, 123:529-34, 1979.
59. LEVY, M.; SICH, M.; PIROTZKY, E.; HABIB, R. Complement activation in acute glomerulonephritis in children, Int. J. Pediatr. Nephrol., Milano, 6:17-24, 1985.
60. Liver Injury by Salicylates. Br. Med. J., London, 2:732, Editorial.
61. LUEKER, R.D.; ABDIN, Z.H.; WILLIAMS Jr., R.C. Peripheral blood T and B lymphocytes during acute rheumatic fever. J. Clin. Invest., New York, 55:975-85, 1975.
62. MAYER, M.M. Complement and complement fixation. In: KABAT, E. & MAYER, M.M. eds. Exp. Immunochemistry. 2. ed. Springfield, Ill., C.C. Thomas, 1971. p. 133-240.
63. MESSIAS, I.T.; SANTAMARIA, J.; RAGIOTTO, R.; DOI, E.M.; BALLA, A.K. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. Submetido para publicação.
64. MILGROM, H.; CURD, J.G.; KAPLAN, R.A.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; VAUGHAN, J.H. Activation of the fourth component of complement (C4): Assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. J. Immunol., Baltimore, 124:2780-85, 1980.
65. MÜLLER-EBERHARD, H.J. Chemistry and function of the complement system. Hosp. Pract., New York, 12:33-43, 1977.
66. MÜLLER-EBERHARD, H.J. & SCHREIBER, R.D. Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. Adv. Immunol., New York, 29:1-51, 1980.
67. MÜLLER-EBERHARD, H.J. & GÜTZE, D. C3 proactivator convertase and its mode of action. J. Exp. Med., New York, 135:1003-8, 1972.
68. NICHOLSON, G.C.; DAWKINS, R.L.; MCDONALD, B.L.; WETHERALL, J.D. A classification of anti-heart antibodies: Differentiation between heart-specific and heterophile antibodies. Clin. Immunol., New York, 7:349-63, 1977.
69. NITSCHKE, J.F.; TUCKER, E.S.; SUGIMOTO, S.; VAUGHAN, J.H.; CURD, J.G. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method of detecting complement activation in plasma. Am. J. Clin. Pathol., Baltimore, 76:679-84, 1981.

70. NYDEGGER, U.E.; ZUBLER, R.H.; GABAY, R.; JOLIAT, G.; KARAGEVREKIS, CH., LAMBERT, P.H.; MIESCHER, P.A. Circulating complement breakdown products in patients with rheumatoid arthritis. Correlation between plasma C3d, circulating immune complexes, and clinical activity. J. Clin. Invest., New York, 59:862-8, 1977.
71. OLIVEIRA, A. Febre Remática. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1983. 239 p.
72. PELTIER, A.P. O Complemento. In: BACH, J-F; AVRAMEAS, S.; BACH, M-A.; BENVENISTRE, J.; CAPRON, A.; PRÉVAL, C.; FAUVE, R.M.; GRISCELLI, C.; LAGRANGE, P.H.; LÉVY, J-P., PAPIERNIK, M.; PREUD'HOMME, J-L.; REVILLARD, J-P.; REYES, F.; SALMON, C. Immunologia. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1982, p. 144-62.
73. PERRIN, L.H.; LAMBERT, P.H.; MIESCHER, P.A. Complement breakdown products in plasma from patients with systemic lupus erythematosus and patients with membrane proliferative or other glomerulonephritis. J. Clin. Invest., New Haven, 56:165-76, 1975.
74. PERRIN, L.H.; NYDEGGER, U.E.; ZUBLER, R.H.; LAMBERT, P.H.; MIESCHER, P.A. Correlation between levels of breakdown products of C3, C4 and properdin factor B in synovial rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., Atlanta, 20:647-52, 1977.
75. PERSELLIN, S.T.; RAMIREZ, G.; MOATAMED, F. Immunopathology of rheumatic pericarditis. Arthritis Rheum., Atlanta, 25:1054-58, 1982.
76. PLATTS-MILLS, T.A.E. & ISHIZAKA, K. Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. J. Immunol., Baltimore, 113:348-58, 1974.
77. POTTER, E.V.; SVARTMAN, M.; MOHAMMED, I.; COX, R.; POON-KING, T.; EARLE, D.P. Tropical acute rheumatic fever and associated streptococcal infections compared with concurrent acute glomerulonephritis. J. Pediatr., St. Louis, 92:325-33, 1978.
78. RACHID FILHO, A.; RACHID, A.; TITTON, J.A.; TITTON, D.C.; BALLA, A.; RADOMINSKI, S.; LUIZ, A.C. Coréia de Sydenham. Enfoque etiopatogênico, diagnóstico e prognóstico. Rev. Bras. Reumat., São Paulo, 22:233-6, 1982.
79. RACHMILEWITZ, M. & SILBERSTEIN, W. The amount of complement in blood in rheumatic fever and rheumatoid arthritis. J. Lab. Clin. Med., St. Louis. 22:1240-45, 1937.
80. READ, S.E.; FISCHETTI, V.A.; UTERMOHLEN, V.; FALK, R.E.; ZABRISKIE, J. B. Cellular reactivity studies to streptococcal antigens. Migration inhibition studies in patients with streptococcal infections and rheumatic fever. J. Clin. Invest., New Haven, 54:439-50, 1974.
81. REIS, G.A.; GASPAR, M.I.C.; BARCINSKI, M.A. Immune recognition in the streptococcal carditis of mice: the role of macrophages in the generation of heart-reactive lymphocytes. J. Immunol., Baltimore, 128:1514-21, 1982.

82. REYES, P.A.; KURY, J.; ATTÍE, F. El sistema de complemento en la fiebre reumática activa. Arch. Inst. Cardiol., México, 43:349-55, 1979.
83. RIJN, V.D.; FILLIT, H.; BRANDEIS, W.E.; REID, H.; POON-KING, T.; MCCARTHY, M.; DAY, N.K.; ZABRISKIE, J.B. Serial studies on circulating immune complexes in post-streptococcal sequelae. Clin. Exp. Immunol., Oxford, 34:318-25, 1978.
84. RODMAN, W.S.; WILLIAMS, R.C. Jr.; BILKA, P.J.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Immunofluorescent localization of the third and fourth component of complement in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, 69:141-50, 1967.
85. ROESEL, C.E. Immunologia. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1981, 284 p.
86. RONCHI Jr., I. Quimiotaxia dos neutrófilos na fase aguda da moléstia reumática. Curitiba, 1984. 91 p. Tese, Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
87. RUDDY, S. Plasma protein effectors of inflammation: Complement. In: KELLEY, W.N.; HARRIS Jr., E.D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C.B. Textbook of Rheumatology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1981. V.1, p. 83-96.
88. RUDDY, S. & AUSTEN, K.F. The complement system in rheumatoid synovitis. Arthritis Rheum., Atlanta, 13:713-23, 1970.
89. SAPRU, R.P.; GANGULY, N.K.; SHARMA, S.; CHANDANI, R.E.; GUPTA, A.K. Cellular reaction to group A beta-haemolytic streptococcal membrane antigen and its relation to complement levels in patients with rheumatic heart disease. Br. Med. J., London, 2:422-4, 1977.
90. SCALLA, L.C.N. Anticorpos anti-valva e anti-miocárdio na doença reumática. Rio de Janeiro, 1982. 102 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
91. SCHEINBERG, M.A. Imunologia e diagnóstico laboratorial na febre reumática. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, 35:185-6, 1980.
92. SCHIFFERLI, J.A.; NG, Y.C.; PETERS, D.K. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. N. Engl. J. Med., Boston, 315:488-95, 1986.
93. SCHRAGER, M.A. & ROTHFIELD, N.F. Pathways of complement activation in chronic discoid lupus. Serological and immunofluorescence studies. Arthritis Rheum., Atlanta, 20:637-45, 1977.
94. SCHUTTE, M.R.; DICAMELLI, M.; MURPHY, P.; SADOVE, M.; GEWURZ, H. C3 Proactivator (C3PA) as an acute phase reactant. Clin. Exp. Immunol., Oxford, 18:251-56, 1974.
95. SENITZER, D. & FREIMER, E.H. Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of rheumatic fever. Rev. Infect. Dis., Chicago, 6:832-9, 1984.
96. SESSO, R.C.C. Deteção de imunecomplexos circulantes em pacientes com glomerulonefrite difusa aguda pós-estreptocócica. São Paulo, 1983. 80 p. Tese, Mestrado. Escola Paulista de Medicina.

97. SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350 p.
98. SILVA, W.D. & KIPNIS, T.L. Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural de um mediador de interações celulares. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, 30:67-72, 1984.
99. SJOHLM, A.G. Complement components in normal serum and plasma quantitated by electroimmunoassay. Scand. J. Immunol., Oxford, 4:25-30, 1975.
100. SNYDERMAN, R. Mecanismos da inflamação e quimiotaxia do leucócito nas doenças reumáticas. Clin. Med. Am. Norte, Rio de Janeiro, 2:227-46, 1986.
101. SOLÉ-VERNIN, C. & LAUS FILHO, J.A. Estreptocóccias Humanas. In: VERNESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7. ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1982, p. 242-63.
102. STITES, D.P. Métodos de laboratório clínico para detecção de antígenos e anticorpos. In: FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J. L.; WELLS, J.V. Imunologia básica e clínica. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1980. p. 336-73.
103. STOLLERMAN, G.H. Rheumatic Fever. In: KELLEY, W.N.; HARRIS, E.O.; RUDDY, S.; SLEDGE, C.B. eds. Textbook of Rheumatology, Philadelphia, Saunders, 1981. V. 2, p. 1306-26.
104. \_\_\_\_\_. Rheumatic Fever. In: ISSELBACHER, K.J.; ADAMS, R.D.; BRAUNWALD, E.; PETERSDORF, R.G.; WILSON, J.D. Harrison's Principles of Internal Medicine. 9.ed. Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, 1980. p. 1090-6.
105. STOLLERMAN, G.H. MARKOWITZ, M.; TARANTA, A.; WANNAMAKER, L.W.; WHITTEMORE, R. Committee report: Jones criteria (revised) for guidance in the diagnosis of rheumatic fever. Circulation, Dallas, 32:664-8, 1965.
106. SVARTMAN, M.; POTTER, E.V.; POON-KING, T.; EARLE, D.P. Immunoglobulins and complement components in synovial fluid of patients with acute rheumatic fever. J. Clin. Invest., New Haven, 56:111-7, 1975.
107. TAN, E.M. & KUNKEL, H.G. An immunofluorescent study of the skin lesions in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., Atlanta, 9:37-46, 1966.
108. TALIBERTI, B.H.B. Estudo comparativo entre a velocidade de hemossedimentação e mucoproteínas séricas como provas laboratoriais de atividade inflamatória no seguimento de pacientes com Artrite Reumatóide. Curitiba, 1983. 101 p. Tese, Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

109. TARANTA, A. Poststreptococcal Diseases: Pathogenetic aspects of rheumatic fever and acute poststreptococcal glomerulonephritis. Pathol. Annu., 8:333-57, 1978.
110. \_\_\_\_\_. Rheumatic Fever. In: McCARTY, D.L. Arthritis and Allied Conditions. 9. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1979, p. 825-70.
111. THEOFILOPOULOS, A.N.; PEREIRA, A.B.; EISENBERG, R.A.; DIXON, F.J. Assays for detection of complement-fixing immune complexes (Raji cell, Conglutining and anti-C3 Assay). In: ROSE, N. & FREIDMAN, H. eds. Manual of Clinical Immunology. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. p. 186-92.
112. UEKI, H.; OKA, D.; TAKEY, Y.; MASUDA, T. Erytema rheumaticum. Hautarzt, Berlin, 32:425-8, 1981.
113. VERROUST, P.; ADAM, C.; SMITH, M.D.; RICHARD LENOBLE, D.; KOURILSKY, O.; MORER-MAROGER, L. Circulating immune complexes and C3d in human parasitosis. Kidney Int., New York, 16:9-14, 1979.
114. WESTERGREN, A. The technique of the red cell sedimentation reaction. Am. Rev. Tuberc., New York, 14:94-101, 1926.
115. WHITNACK, E. & BISNO, A.L. Rheumatic fever and other immunologically mediated cardiac diseases. In: PARKER, C.W., ed. Clinical immunology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1980. p. 894-929.
116. WILLIAMS Jr., R.C. Rheumatic fever and the streptococcus. Another look at molecular mimicry. Am. J. Med., New York, 75:727-30, 1983.
117. WILLIAMS Jr., R.C. & LAW, D.H. Serum complement in connective tissue disorders. J. Lab. & Clin. Med., St. Louis., 52:273-81, 1958.
118. WILLIAMS Jr., R.C.; ZABRISKIE, J.B.; MAHROS, F.; HASSABALLA, F.; ABDIN, Z.H. Lymphocyte surface markers in acute rheumatic fever and post-streptococcal acute glomerulonephritis. Clin. Exp. Immunol., Oxford, 27:135-42, 1977.
119. WILLIAMS Jr., R.C.; WALKER, L.C.; KASSABY, M.; MAHROS, F.; HASSABALLA, F.; ABDIN, Z.H.; TUNG, K.S.K. Circulating immune complexes in acute rheumatic fever. J. Clin. Lab. Immunol., Edinburgh, 2:185-90, 1979.
120. WILSON, M.G. Advances in Rheumatic Fever. 1940-1961. New York, Harper & Row, 1962. 249 p.
121. WILSON, M.R.; ARROYAVE, C.M.; NAKAMURA, R.M.; VAUGHAN, J.H.; TAN, E.M. Activation of the alternative complement pathway in systemic lupus erithematosus. Clin. Exp. Immunol., Oxford, 26:11-20, 1976.
122. WINZLER, R.J.; DEVOR, A.W.; MEHL, J.W.; SMITH, I.M. Studies on the mucoproteins of human plasm. I - Determination and isolation. J. Clin. Invest., New York, 27:609-16, 1948.
123. YANG, L.C.; SOPREY, P.R.; WITTNER, M.K.; FOX, E.N. Streptococcal-induced cell-mediated-immune destruction of cardiac myofibers in vitro. J. Exp. Med., New York, 146:344-60, 1977.

124. ZABRISKIE, J.B. Rheumatic fever: the interplay between host, genetics, and microbe. Circulation, Dallas, 71:1077-86, 1985.
125. ZABRISKIE, J.B.; LAVENCHY, D.; WILLIAMS Jr.; R.C.; FU, S.M.; YEDON, C.A.; FOTINO, M.; BRAUN, D.G. Rheumatic fever - associated B cell alloantigens as identified by monoclonal antibodies. Arthritis Rheum., Atlanta, 28:1047-51, 1985.
126. ZIMMERMAN, H.J. Aspirin induced hepatic injury. Ann. Int. Med., Philadelphia, 80:103-5, 1974. Editorial.
127. ZUBLER, R.H.; NYDEGGER, U.; PERRIN, L.H.; FEHR, K.; McCORMICK, J.; LAMBERT, P.H.; MIESCHER, P.A. Circulating and intra-articular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of <sup>125</sup>I-Clq binding activity with clinical and biological features of diseases. J. Clin. Invest., New York, 57:1308-19, 1976.
128. ZUBLER, R.H. & LAMBERT, P.H. Detection of immune complexes in human diseases. Prog. Allergy, Basel, 24:1-48, 1978.



**ANEXOS**

## Anexo 1 - Protocolo de Investigação em Moléstia Reumática

Departamento de Clínica Médica

Protocolo nº \_\_\_\_.

I - IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Residência: \_\_\_\_\_

Entrada no Hospital: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_\_\_

Contato estável: \_\_\_\_\_

Assinalar com "x" entre os parênteses as respostas SIM ou NÃO

II - HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

1º Surto ( ) Outros ( ) IVAS recentes ( ) Sintomas ge-  
rais ( ) Artrite ( ) Artralgia ( ) Articulações envolvi-  
das ( ) Dor em coluna cervical ( )

III - REVISÃO DE SISTEMASPele: "Rash" ( ) Raynaud ( ) Úlcera ( ) Alopecia ( )

Prurido ( ) Unhas ( ) Fotossensibilidade ( )

Eritema marginado ( ) Nódulos ( )

Olhos: Conjuntivite ( ) Diminuição da visão ( ) Uveíte ( )  
Olhos secos ( )

---

Boca: Úlceras bucais ( ) Boca seca ( ) Dor e aumento de volume das parótidas ( )

---

Nariz: Congestão nasal ( ) Sinusite ( ) Epistaxe ( )

---

Tórax: Dor pleurítica ( ) Dispnéia de esforço ( ) Tosse ( )  
Expectoração ( ) Hemoptise ( )

---

Coração: Ortopnéia ( ) Dispnéia paroxística noturna ( ) Batimentos irregulares ( )

---

Gastrointestinal: Anorexia ( ) Disfagia ( ) Pirose ( )  
Dor abdominal ( ) Náuseas ( ) Vômitos ( ) Hematêmese ( )  
Melena ( ) Icterícia ( ) Diarréia ( )

---

Geniturinário: Disúria ( ) Hematúria ( ) Piúria ( ) Descarga uretral ( ) Nictúria ( )

---

Ginecológico: Amenorréia ( ) Corrimento vaginal ( )

---

Neuromuscular: Convulsões ( ) Parestesias ( ) Fraqueza muscular ( ) Coréia de Sydenham ( ) Movimentos involuntários

sem sentido, rápidos, fraqueza muscular, atetose presente durante o sono, alteração da mímica facial, movimentos da língua, diferença na caligrafia, problemas na escola ( )

---

---

#### IV - HISTÓRIA MÓRBIDA FAMILIAR

Contato familiar recente ( ) Doença semelhante na família ( )  
Outras doenças na família ( )

---

#### V - TRATAMENTOS

Para a doença atual, doses, efeitos ( ) Antibióticos ( )  
Alergia a medicamentos ( ) Vacinação recente ( ) Outros ( )

---

#### VI - EXAME FÍSICO

Peso: \_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_ Pressão arterial: \_\_\_\_ Temperatura axilar: \_\_\_\_  
Pulso: \_\_\_\_ Movimentos respiratórios: \_\_\_\_  
Qualidade como informante: \_\_\_\_ Marcha: \_\_\_\_  
Estado geral: \_\_\_\_

Pele: Púrpura ( ) Psoríase ( ) "Rash" eritematoso ( ) "Livedo reticularis" ( )  
Úlceras digitais-perna-mucosa ( ) Eritema marginado ( ) Eritema nodoso ( ) Nódulos ( )

---

Pescoço: Fundo-de-olho ( ) Escleróticas ( ) Conjuntivas ( )  
Uveíte ( ) Dor-aumento de volume das parótidas ( ) Secura de olhos-nariz-boca ( )  
Úlceras bucais e nasais ( ) Ouvidos ( )

---

Linfadenopatia: Cervical ( ) Axilar ( ) Inguinal ( )

---

Tórax: (Inspeção, Palpação, Percussão, Ausculta)

---

Coração: "Ictus" ( ) Atrito pericárdico ( ) Ritmo ( )

Outros ( ) Sopros ( )

---

Artérias: Pulsos periféricos ( ) Raynaud ( )

---

Abdome: Hepatomegalia ( ) Esplenomegalia ( ) Sensibilidade à palpação ( ) Outros ( )

---

Genitália: Ulcerações ( ) Corrimento uretral ( )

---

Músculos: Atrofia ( ) Dor à palpação ( ) Fraqueza muscular ( ) Proximal ( ) Distal ( )

---

Neurológico: Reflexos ( ) Tremor ( ) Movimentos anormais ( ) Caligrafia ( ) Reflexo pendular ( ) Língua ( ) Elevar ambos os braços sobre a cabeça ( ) Aperto de mão prolongado ( )

---

Articulações: Interfalangianas proximais ( ) Metacarpofalângianas ( ) Punho ( ) Cotovelo ( ) Ombro ( ) Coxo-femoral ( ) Joelhos ( ) Tornozelos ( ) Metatarsofalângianas ( )

Coluna cervical ( ) Dorsal ( ) Lombar ( ) Sacroilíacas ( )  
Esterno-clavicular ( )

Anotar: dor à palpação - dor à mobilização - aumento de volume,  
eritema e calor local - grau de limitação - ângulo de  
Schober.

---

---

---

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA  
INFORMAÇÕES LABORATORIAIS SERIADAS

<u>Hematologia</u>						
1) Hemograma	dia: 1	5	10	30	90	180
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )						
Hematócrito (ml/dl)						
Hemoglobina (g/dl)						
VCM (fl)						
HCM (pg)						
CHCM (g/dl)						
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )						
Segmentados						
Bastões						
Basófilos						
Linfócitos						
Monócitos						
Eosinófilos						
Plaquetas ( $/\text{mm}^3$ )						
Reticulócitos (%)						
2) VHS 1ª hora (mm)						
3) Prova de falcização						

URINA	dia:	1	5	10	30	90	180
pH							
Glicose							
Hemácias							
Proteínas							
Cilindros							
Leucócitos							
"Clearance" de creatinina							
Proteinúria de 24 horas							
BIOQUÍMICA	dia:	1	5	10	30	90	180
Glicose							
Uréia							
Creatinina							
Bilirrubinas totais							
Bilirrubina direta							
Bilirrubina indireta							
Proteínas totais							
Albumina							
Fosfatase alcalina							
SGOT							
SGPT							
Mucoproteínas							



### ROTINA DE INVESTIGAÇÃO

- 1) Hemograma completo
- 2) Velocidade de hemossedimentação
- 3) Dosagem de mucoproteína sérica e proteína C-reativa
- 4) Titulação de antiestreptolisina O, e, se negativo, teste do "Streptozyne"
- 5) Cultura de orofaringe
- 6) Antígeno HBs
- 7) Urinálise com dosagem semiquantitativa de proteínas
- 8) Dosagem de transaminases, bilirrubinas e fosfatase alcalina
- 9) Radiografia de tórax, pôsterio-anterior e perfil esquerdo com esôfago contrastado
- 10) Eletrocardiograma (ECG)

### SE HOUVER INDICAÇÃO CLÍNICA

- 1) Provas de falcização das hemácias
- 2) Pesquisa do fator reumatóide pelas provas de látex e Waaler-Rose
- 3) Pesquisa de fatores antinucleares
- 4) Pesquisa de gonococos: cultura e esfregaços corados pelo Gram
- 5) Teste de aglutinação para Brucelose
- 6) Ecocardiograma
- 7) Hemoculturas
- 8) Eletroforese de proteínas

SOROLOGIA	dia:	1	5	10	30	90	180
HBs							
Látex							
Waler-Rose							
FAN							
LE							
ASO							
"Streptozyne"							
C4d/C4							
Ba							
Proteína C-reativa							
Wright-Semple							

## BACTERIOLOGIA (Anotar o dia)

Cultura de orofaringe

Pesquisa de gonococos

Hemoculturas

## PARASITOLOGIA (Anotar o dia)

## ELETROCARDIOGRAMAS (Laudos)

1º dia

5

10

30

90

180

## RADIOGRAFIA DE TÓRAX (PA/PE)

1º dia

-----

Outros

-----

## ECOCARDIOGRAMAS (Laudos)

Dia

-----

-----

## TRATAMENTO E EVOLUÇÃO CLÍNICA NOS PERÍODOS:

-----

-----

## Anexo 2 - Pacientes com Moléstia Reumática Aguda - Identificação

PACIENTES	NOME	IDADE (anos)	COR	SEXO	REGISTRO
M.R. 1	O.P.M.	15	B	F	810.887
M.R. 2	E.F.R.	26	B	F	440.179
M.R. 3	V.F.A.	16	B	M	611.759
M.R. 4	I.L.S.	27	B	F	627.452
M.R. 5	L.G.C.	8	B	F	620.326
M.R. 6	M.G.	14	B	M	829.560
M.R. 7	R.S.	20	Pd	M	420.072
M.R. 8	A.C.O.	14	B	M	828.973
M.R. 9	I.O.S.	22	B	F	sem registro
M.R.10	T.E.C.	14	Pd	M	071.416
M.R.11	L.F.D.	14	B	F	837.922
M.R.12	A.R.S.	33	B	F	832.601
M.R.13	C.P.B.	17	B	F	362.338
M.R.14	M.L.M.	27	B	F	130.687
M.R.15	L.S.	21	B	F	399.702
M.R.16	O.O.	16	B	M	583.226
M.R.17	O.O.S.	16	B	F	622.631
M.R.18	F.A.B.	6	B	M	621.148
M.R.19	A.S.M.	27	B	F	622.873
M.R.20	A.C.V.	13	B	M	624.035
M.R.21	V.A.P.	9	B	F	620.684
M.R.22	R.F.K.	19	B	F	620.625
M.R.23	V.V.F.	14	B	F	628.248
M.R.24	W.C.L.	10	B	M	616.910

B = Branco Pd = Pardo

M = Masculino F = Feminino

### Anexo 3 - Dados Clínicos dos Pacientes com Moléstia Reumática Aguda

Pacientes	Artrite	Cardite	Coréia de Sydenham	Surto anterior M.R.	Lesão valvar prêvia	Febre	Nódulos de Meynet/ eritema marginado
M.R. 1	+	0	0	+	0	0	0
M.R. 2	+	+	0	+	+	0	0
M.R. 3	+	0	0	+	0	+	0
M.R. 4	+	0	0	0	0	+	0
M.R. 5	+	+	0	0	0	+	0
M.R. 6	+	+	0	+	0	0	0
M.R. 7	+	0	0	+	+	+	0
M.R. 8	+	+	0	+	0	+	0
M.R. 9	+	0	0	0	0	0	0
M.R.10	+	0	0	0	0	+	0
M.R.11	+	0	0	0	0	+	0
M.R.12	+	0	0	+	0	0	0
M.R.13	+	+	0	+	0	+	0
M.R.14	+	+	0	+	+	+	0
M.R.15	+	0	0	+	0	+	0
M.R.16	0	0	+	+	+	0	0
M.R.17	0	0	+	+	+	0	0
M.R.18	+	+	+	0	0	+	0
M.R.19	+	+	0	+	0	+	0
M.R.20	+	+	0	0	+	+	0
M.R.21	0	+	0	+	0	+	0
M.R.22	+	0	0	+	0	0	0
M.R.23	0	+	0	+	+	0	0
M.R.24	+	0	0	0	+	+	0
Total	20/24	11/24	3/24	16/24	8/24	15/24	0/24

+ = presente

0 = ausente

Anexo 4 - Dados Laboratoriais dos Pacientes com Moléstia Reumática Aguda

Pacientes	Mucoproteínas (mg% de tirosina)	VHS Westergren (mm 1ª h)	Proteína C-reativa (látex)	Título de ASO (u. Todd)		Teste do "Streptozyne"
				1º dia	10º dia	
M.R. 1	8,1	90	+	333	625	
M.R. 2	4,9	63	+	250	1250	+
M.R. 3	9,0	77	+	500	833	
M.R. 4	2,97	90	+	166	166	+
M.R. 5	9,3	29	-	1250	833	
M.R. 6	13,1	40	+	1250		
M.R. 7	7,25	15	+	625	833	
M.R. 8	5,22	50	+	500		+
M.R. 9	8,75	55	+	833		
M.R.10	8,1	12	+	500		
M.R.11	6,68	15	+	250		+
M.R.12	5,0	85	+	1250	1250	
M.R.13	6,1	75	+	625	833	
M.R.14	10,8	120	+	1250	1250	
M.R.15	6,1	54	-	100	100	+
M.R.16	3,31	30	-	833	500	
M.R.17	3,37	39	+	250		- *
M.R.18	2,92	23	-	1250	833	
M.R.19	5,25	109	+	625		
M.R.20	6,6	20	+	833	1250	
M.R.21	12,7	100	+	250	100	+
M.R.22	5,2	98	+	625	833	
M.R.23	4,24	28	-	833	166	
M.R.24	6,5	60	-	166	166	+

\* Teste do "Streptozyne" negativo no 1º e 5º dia

Anexo 5 - Dosagem de Imunecomplexos Circulantes no Soro do Grupo-Controle, usando-se o Ensaio do Fator Reumatóide Monoclonal (% de precipitação de  $^{125}\text{I}$ -FRm) e o da Conglutinina (% de ligação de  $^{125}\text{I}$ -anti-IgG)

SORO Nº	FRm	K
1	1,9	3,3
2	2,2	3,3
3	1,9	1,0
4	2,2	3,6
5	2,3	3,4
6	1,4	3,5
7	3,9	3,7
8	0,9	5,0
9	2,2	1,4
10	3,1	1,9
11	1,9	3,9
12	2,4	2,5
13	2,1	3,5
14	2,8	3,9
15	8,1	7,1
16	3,3	ND
17	1,3	2,7
18	1,8	3,5
19	1,4	3,1
20	2,1	3,4
21	1,7	2,1
22	2,8	1,0
23	2,2	4,1
24	5,9	4,7
25	1,8	1,0
26	1,9	4,9
27	2,1	1,6
28	3,2	2,4
29	2,3	5,5
30	2,9	5,0
31	2,7	2,8
32	2,2	1,8
$\bar{X}$	2,52	3,24
S	1,35	1,40

ND = Não-Determinado

Anexo 6 - Dosagem de Imunocomplexos Circulantes em Pacientes com Moléstia Reumática Aguda, Usando-se o Ensaio do Fator Reumatóide Monoclonal (% de precipitação de  $^{125}\text{I}$ -FRm) e o da congulinina (% de ligação de  $^{125}\text{I}$ -anti-IgG)

SORO Nº	DIA/MÊS	FRm	K
1	1º dia	4,7	3,6
	3º mês	1,8	3,9
	6º mês	1,5	2,1
2	1º dia	4,6	4,9
	3º mês	5,2	5,4
	6º mês	2,4	3,9
3	1º dia	2,0	2,3
	3º mês	2,4	2,7
	6º mês	2,9	4,0
4	1º dia	ND	ND
	3º mês	ND	ND
	6º mês	3,2	2,6
5	1º dia	3,9	2,2
	3º mês	ND	ND
	6º mês	2,8	2,2
6	1º dia	1,9	2,7
	3º mês	1,4	2,6
	6º mês	ND	ND
7	1º dia	11,9	5,9
	3º mês	4,7	5,4
	6º mês	ND	ND
8	1º dia	3,6	4,2
	3º mês	ND	ND
	6º mês	2,1	1,5
9	1º dia	2,6	2,3
	3º mês	ND	ND
	6º mês	5,2	2,2
10	1º dia	ND	ND
	3º mês	1,5	7,5
	6º mês	1,2	6,7
11	1º dia	ND	ND
	3º mês	3,5	5,7
	6º mês	2,1	4,7
12	1º dia	ND	ND
	3º mês	1,9	3,9
	6º mês	1,7	3,8

(continua)



(continuação)

SORO Nº	DIA/MÊS	FRm	K
13	1º dia	2,9	2,9
	3º mês	ND	ND
	6º mês	2,9	4,3
14	1º dia	2,8	3,2
	3º mês	ND	ND
	6º mês	ND	ND
15	1º dia	4,7	3,1
	3º mês	ND	ND
	6º mês	4,3	4,3
16	1º dia	4,6	3,9
	3º mês	2,5	3,9
	6º mês	3,0	4,6
17	1º dia	1,9	3,6
	3º mês	ND	ND
	6º mês	ND	ND
18	1º dia	1,2	4,2
	3º mês	1,3	4,2
	6º mês	1,8	3,3
19	1º dia	2,2	6,0
	3º mês	1,4	4,3
	6º mês	1,3	4,3
20	1º dia	1,4	1,4
	3º mês	1,7	1,9
	6º mês	1,4	1,6
21	1º dia	ND	1,5
	3º mês	3,0	1,9
	6º mês	2,1	2,6
22	1º dia	3,5	7,5
	3º mês	3,8	5,8
	6º mês	2,6	5,8
23	1º dia	ND	ND
	3º mês	ND	ND
	6º mês	ND	ND
24	1º dia	0,9	3,5
	3º mês	1,3	3,4
	6º mês	ND	ND

ND = Não-Determinado

## Anexo 7 - Testes de McNemar - Tabelas (TA)

TA-1 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a presença de cardite.

CARDITE	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	6	5	11
NÃO	4	9	13
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.  
 $P = 0,5000$  ou  $50,0\%$  Discordância não-significante.

TA-2 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença de níveis de C4d/C4 e a presença de cardite.

CARDITE	C4d/C4		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	11	0	11
NÃO	13	0	13
TOTAL	24	0	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.  
 $P = 0,0001\%$  ou  $0,00\%$  Discordância significativa.

TA-3 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a presença de artrite.

ARTRITE	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	9	11	20
NÃO	1	3	4
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,003^*$  ou 0,30%      Discordância significativa.

TA-4 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a presença de mucoproteínas alteradas.

MUCOPROTEÍNAS	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	10	11	21
NÃO	0	3	03
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,000^*$  ou 0,0%      Discordância significativa.

TA-5 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a presença de proteína C-reativa.

PROTEÍNA C-REATIVA	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	10	8	18
NÃO	0	6	6
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,0040^*$  ou  $0,40\%$  Discordância significativa.

TA-6 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença de níveis de C4d/C4 e a presença de proteína C-reativa.

PROTEÍNA C-REATIVA	C4d/C4		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	18	0	18
NÃO	06	0	6
TOTAL	24	0	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,0160^*$  ou  $1,60\%$  Discordância significativa.

TA-7 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a alteração do número de leucócitos.

LEUCÓCITOS	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	9	11	20
NÃO	1	3	4
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,0030^*$  ou 0,30% Discordância significativa.

TA-8 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a alteração do VHS.

VHS	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	8	12	20
NÃO	2	2	4
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.

$P = 0,0060^*$  ou 0,60% Discordância significativa.

TA-9 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre a presença do fragmento Ba e a presença de coréia de Sydenham.

CORÉIA	FRAGMENTO Ba		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	0	3	3
NÃO	10	11	21
TOTAL	10	14	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.  
 $P = 0,0460^*$  ou 4,60%      Discordância significativa.

TA-10 - Pacientes com M.R. segundo os resultados observados entre os níveis de C4d/C4 e a presença de coréia de Sydenham.

CORÉIA	C4d/C4		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
SIM	3	0	3
NÃO	21	0	21
TOTAL	24	0	24

Teste de McNemar com aproximação à distribuição binomial.  
 $P = 0,0000^*$  ou 0,00%      Discordância significativa.